CHRISTOPH EMMINGER

DNA-SYNTHESE VON RATTENLEBERZELLEN NACH TEILHEPATEKTOMIE UND HYDROXYHARNSTOFF-DAUERBEHANDLUNG. IN VITRO-UNTERSUCHUNGEN MIT METHODEN DER AUTORADIOGRAPHIE, FLÜSSIGKEITS-SCINTILLATIONSMESSUNG UND IMPULSCYTOPHOTOMETRIE

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Hartmut Rabes
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Max Eder
Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 29.1.1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547022_0032

Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

Herrn Professor Dr.med.H.M. RABES danke ich für die Themastellung und für die Unterstützung bei dieser Arbeit.

Ein Teil der Versuche und einzelne Abschnitte der vorliegenden Dissertation wurden gemeinsam mit Herrn G.MANOLIKAKIS im Rahmen seiner Dissertation mit dem Thema"In Vitro Untersuchungen zur Mitoseaktivität isolierter Hepatozyten an Rattenleber nach Teilhepatektomie und Hydroxyharnstoff-Dauerbehandlung"erarbeitet.

Die experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit wurden mit finanzieller Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG Leberzellen in vivo und in vitro	1
2.	HAUPTTEIL	8
2.1.	Material und Methode	8
2.1.1.	Hydroxyharnstoff-Infusion	8
2.1.2.	Leberperfusion	9
2.1.2.1.	Übersicht der verschiedenen Perfusionsmethoden	9
2.1.2.2.	Technische Vorbereitung,Perfusionslösung	11
2.1.3.	Eigene optimierte Perfusionsmethode	12
2.1.4.	Zellisolation	16
2.2.	Untersuchungsmaterial	19
2.2.1.	Vitalitätsfärbung,Zellzählung,unmittelbare Zellausstriche	19
2.2.2.	Autoradiographie,Scintillationsmessung	19
2.3.	Impulscytophotometrie	21
2.3.1.	Gewinnung des Untersuchungsmaterials,Zellpräparation,Einstellung des Gerätes	26
3.	ERGEBNISSE	33
3.1.	Zellisolation	33
3.1.1.	Vorperfusion	33
3.1.2.	Enzymperfusion	34
3.1.3.	Versuchsgruppen	38
3.1.4.	Zellausstriche	41
3.2.	Autoradiographie und Scintillationsmessung	44
3.2.1.	Kontrollversuch	45
3.2.2.	Scintillationsmessung und Autoradiographie von Leberzellen nach 2/3-Hepatektomie und 25-stündiger HU-Infusion	46
3.2.2.1.	Scintillationsmessung	47
3.2.2.2.	Autoradiographie	48

		Seite
3.3.	Ergebnisse der Impulscytophotometrie	50
3.3.1.	Technische Eichung	50
3.3.2.	Biologische Eichung	50
3.3.3.	Grundlage der Histogrammauswertung	51
3.3.4.	Standard-Histogramm:Leberzellen eines vor der Collagenase-Perfusion unbehandelten Tieres(2oo gr)	52
3.3.5.	Leberzellhistogramm eines unbehandelten Tieres 35ogr KG	55
3.3.6.	Histogramm von Leberzellen adulter Tiere in verschiedenen Abständen nach Hepatektomie	55
3.3.7.	Stündliche Histogramme von Leberzellen während 7-stündiger Inkubation 14 Stunden nach Hepatektomie	57
3.3.8.	Leberzellhistogramme nach Hepatektomie und Hydroxyharnstoffinfusion in verschiedenen Abständen nach HU-Infusionsende isoliert	58
3.3.9.	Stündliche Histogramme isolierter und inkubierter Leberzellen nach Hepatektomie und HU-Infusion	60
4.	DISKUSSION	70
4.1.	Technik der Perfusion und Zellisolation	71
4.1.1.	Zellvitalität	72
4.1.2.	Zellzahl	75
4.2.	Inkubationsbedingungen,Vitalitäts- und pH-Veränderungen während der Inkubation	76
4.3.	Autoradiographie und Scintillationsmessung	77
4.4.	Probleme der Impulscytophotometrie	81
4.4.1.	Präparation	82
4.4.2.	Ethidiumbromid als Fluoreszenzfarbstoff	84
4.4.3.	Auswertung der Histogramme	85
4.4.4.	Beeinflußung der Ergebnisse durch apparative und technische Schwierigkeiten	86
4.5.	Erörterung der Leberzellhistogramme	90

		Seite
4.5.1.	Inkubation von Leberzellen 14 Stunden nach Hepatektomie über 7 Stunden	96
4.5.2.	Histogramme von Leberzellen nach Hepatektomie und HU-Infusion	97
4.5.3.	Histogramme von Leberzellen unmittelbar nach Zellisolation	98
4.5.4.	Histogramme inkubierter Leberzellen	100
4.6.	Vergleich der Untersuchungsmethoden Autoradiographie und Impulscytophotometrie	103
4.7.	In vivo applizierter Hydroxyharnstoff und seine Wirkung auf Leberzellen in vitro	104
5.	ZUSAMMENFASSUNG	107
6.	ABBILDUNGEN	110
7.	LITERATURVERZEICHNIS	143

Material und Firmen

Hydroxyharnstoff	HU,reinst,Serva Feinbiochemica,Heidelberg
Collagenase	Serva Feinbiochemica Heidelberg von Clostridium histolyticum o,32 U/mg =216 Mandl-U/mg Mat.
RNAse	Serva Feinbiochemica Heidelberg from bovine pancreas, 1oo Kunitz-U/mg,5x cryst.
Pepsin	Merck,Darmstadt 25ooo FIP-U/g =35ooo E+g DAB 6 Verdauungsvermögen 1:35ooo
Ethidium Bromid	Serva Feinbiochemica Heidelberg
Trispuffer	reinst,Serva Feinbiochemica Heidelberg
6-3H Thymidine	Radiochemical Centre,Amersham England spez.Aktivität: 5 Ci/mmol
TCM-199	Seromed,München Medium ohne $NaHCO_3$,mit Phenolrot und L-Glutamin
Zentrifuge	Beckman Model T J-6
Perfusor IV	Braun-Melsungen
Perfusor-Besteck	Nr. 725oo Braun-Melsungen
Infusionsleitung für HU-Infusion	Nr. 72295 Braun-Melsungen
Infusionsleitung für Leberperfusion	Nr. R-71 Pfrimmer
Beckman pH-Meter	Expandomatic SS 2

Filmemulsion für Autoradiographien	ILFORD K2 England
ICP-11	Impulscytophotometer Firma Phywe,Göttingen
Schüttelbad	Braun-Melsungen
Mikroskop	Leitz SM-Lux,Wetzlar
Scintillations-messgerät	Packard Modell 2425

Abkürzungen

HU	Hydroxyharnstoff
KG	Körpergewicht
Part.Hep.	partielle Hepatektomie
3H-TdR	6-3H-Thymidin
HEPES	4-(2-Hydroxyäthyl)-piperazinyl(1)-äthansulfonsäure
Ebr	Ethidiumbromid
CMF-Hanks	Ca^{++}-Mg^{++}- freie Hanks-Lösung

Einleitung:

1. Leberzellen in vivo und in vitro

Die Leber ist aufgrund ihrer hohen regeneratorischen Potenz ein geeignetes Objekt für Untersuchungen über den Regenerationsmechanismus.

Bei lokalen oberflächlichen Verletzungen des Organs treten nach einer gewissen Zeit Proliferationsvorgänge im Verletzungsbereich auf, nach größeren Parenchymverletzungen sind diese Vorgänge generalisiert nachweisbar. Die Entwicklung einer standardisierten 2/3-Leberteilresektion bei Ratten ermöglichte eine genauere Untersuchung über den Verlauf der einzelnen Zellzyklusphasen der regenerierenden Leber. So wurde in vivo durch den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in die Leberzellen nach partieller Hepatektomie festgestellt, daß der Beginn der DNA-Synthese zwischen der 12. und 18. Stunde, das Maximum 20 - 26 Stunden nach der Operation erreicht wird. Der Gipfel der Zahl von Zellen, die anschließend die Mitose durchlaufen, liegt 6 - 8 Stunden nach der DNA-Synthese, das heißt 26 - 33 Stunden postoperativ. Für das Auslösen dieser Vorgänge werden humorale, mechanisch-hämodynamische und funktionelle Faktoren diskutiert.

Über den Steuerungsmechanismus der komplexen Faktoren, welche in Leberzellen erwachsener Ratten in vivo zahlreiche Stoffwechselfunktionen kontrollieren, ist wenig bekannt. Der größte Teil der Zellen befindet sich in einem ruhenden Kompartment, einem "steady-state" System, in dem nur ein sehr geringer Anteil von Zellen mit seiner Proliferation (Mitoseindex 0,1%), (4) den ständigen Zellverlust ersetzt. Nach einem Reiz wie einer partiellen Hepatektomie beginnt in der Leber eine Proliferationswelle. In-vitro-Untersuchungen von Leberzellen könnten neue Aspekte zur Untersuchung eines Steuerungsmechanismus der Zellregeneration bie-

ten. Dabei sind aufgrund der bisher in der Literatur berichteten Ergebnisse verschiedene Punkte zu unterscheiden:

Leberzellen fetaler Ratten oder von Tieren, die nur wenige Tage alt sind, zeigen in Kultur eine höhere Proliferationsrate als gleiche Zellen erwachsener Tiere. Die DNA-Syntheseaktivität ist dabei um das Doppelte höher als im Explantat regenerierender Rattenleber 48 Stunden nach 2/3-Hepatektomie und um den Faktor 12 größer als im Explantat unbehandelter, adulter Rattenlebern (13). Der Zeitpunkt, in dem das Lebergewebe im Explantat die größte Proliferationstendenz zeigt, liegt bei Gewebsentnahme 3-5 Tage post partum (12). Das Wachstumsverhalten der embryonalen und juvenilen Leberzellen ist in vitro von der Interaktion verschiedener Faktoren abhängig, wie Serumfaktoren (12, 20), Kombinationen verschiedener körpereigener Hormone und Aminosäuren (1, 2, 5, 13), die möglicherweise in ähnlicher Weise auch das Wachstumsverhalten der Leberzellen in vivo beeinflussen (13). Auch die Proliferationskinetik, die Dauer der DNA-Synthesephase und der Mitose juveniler Leberzellen in vitro stimmen mit in vivo erhobenen Befunden überein (12). Leberzellen können als epithel-ähnliche Zellverbände über längere Zeiträume in Kultur gehalten werden (13).

Mit verschiedenen Methoden wird seit langem versucht, Leberzellen adulter Ratten in Kultur zu halten, sei es als Explantat (13) oder als Monolayer in primären Zellkulturen (3, 4, 6, 7, 10, 11, 18, 19). Je nach Ziel der Untersuchung werden die Zellen intakter Tiere zur Untersuchung von Stoffwechselfunktionen der Leber oder die von Tieren nach partieller Hepatektomie zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens verwendet. Unter verschiedenen Kulturbedingungen zeigen hierbei die Leberzellen von intakten Organen einige charakteristische Stoffwechselfunktionen, die die Leberzelle auch in vivo zeigt; z.B. die Synthese von Glukose, Glykogen, Albumin (9), Proteinen und Aminosäuren (6, 4), eine relativ

konstante ATP-Konzentration über mehrere Tage (9), Enzyminduktion der O-Demethylase mit gleichzeitigem Abfall der Glukose-6-phosphatase, Pyruvatkinaseaktivität (11), schließlich der Abbau geschädigter Erythrozyten durch Sinusoidalzellen (14). Leberzellen adulter Tiere mit diesen charakteristischen Funktionen zeigen jedoch in Kultur fast keine Proliferation (Mitoseindex 0,1%), (17, 18). Normale Hepatozyten scheinen eher für einige Tage in Monolayer-Kulturen überleben und ihre Funktionen beibehalten zu können, wenn das Kulturmedium ohne proliferationsfördernde Zusätze ist (9, 10, 11). Wenn auch nicht alle spezifischen Funktionen fehlen, so scheint doch eine mitotische Aktivität der Hepatozyten gleichzeitig mit der Ausprägung spezifischer metabolischer Funktionen nicht vereinbar zu sein (9, 10, 11). Lediglich Zellen erwachsener Tiere, deren Leber einer 2/3-Hepatektomie unterzogen wurde, zeigen eine erhöhte DNA-Syntheserate. Auch die Zahl beobachteter Mitosen ist höher als bei den Kulturen unbehandelter Tiere (11). Ein zweiter Anstieg der DNA-Synthese, wie er in vivo beobachtet wird, erfolgt in der Kultur nicht. 4 Tage nach partieller Hepatektomie isolierte Leberzellen adulter Ratten zeigen in Monolayerkulturen nur noch eine minimale DNA-Syntheseaktivität (9).

Schon in der Leber in vivo zeigt sich, daß innerhalb eines Leberlappens die Zellen keineswegs eine einheitliche Zellpopulation darstellen. Innerhalb der Funktionseinheit des Leberparenchyms (Einteilung nach Rapaport, 1954) zeigen sich die morphologischen Unterschiede zwischen den Zellen der einzelnen Zonen. Die Enzyme der aeroben Energietransformation liegen bevorzugt in den Zellen des periportalen Bereichs (Zone I), biosynthetische Funktionen laufen weitgehend in Zone III ab (31). Für die Untersuchung des Proliferationsverhaltens wurde die Zwischenzone zwischen Periportalfeld und Vena hepatica über die Einteilung von Grisham (28) hinaus noch genauer unterteilt (27, 31). Während in der intakten Leber proliferierende Zellen scheinbar zufällig über

den Leberlappen verteilt liegen (28), folgt nach partieller Hepatektomie die Zunahme proliferierender Zellen einem festgelegten Muster: Beginn und größter Anstieg der DNA-Synthese 18 - 24 Stunden nach part. Hep. periportal mit kontinuierlichem Höhenabfall und zeitlicher Verzögerung bis zum perivenösen Bereich, ein zweiter, jedoch niedrigerer DNA-Gipfel 40 - 42 Stunden nach part. Hep. vorwiegend im periportalen Bereich (27, 31).

In Kulturen mit ihrem gegenüber den in vivo-Verhältnissen veränderten Mikromilieu scheinen die Leberzellen Veränderungen in Struktur und Funktion zu durchlaufen (9, 10). Sie verlieren offensichtlich einen Großteil ihrer differenzierten Funktionen und zeigen oft eine unterschiedliche Feinstruktur. Es scheint daher schwierig zu sein, einerseits aus den Ergebnissen in vitro Aussagen über die Leberzellen in vivo zu machen, andererseits auch die Zellen in vitro als Leberparenchymzellen zu differenzieren. Man erhält durch die verschiedenen Isolationsmethoden nicht nur eine Population von Hepatozyten verschiedenster Funktionszustände, sondern auch, anteilig wie in vivo, ca. 40% nicht-parenchymale Zellen, vorwiegend Fibroblasten neben Kupffer- und Sinusoidalzellen sowie Zellen der größeren Gallengänge (10). Über den Anteil dieser nicht-parenchymalen Zellen in Kultur besteht keine einhellige Meinung: einerseits wird über das deutliche Fehlen Collagen-produzierender Fibroblasten berichtet, was auf den Gebrauch von Collagenase bei der Isolation zurückzuführen sei (7), andererseits seien Kulturen und Zellsuspensionen gerade mit Fibroblasten und anderen Nichthepatozyten angereichert durch eine bevorzugte Schädigung der Hepatozyten durch die Enzyme (10). Entsprechend den in vivo erhobenen Befunden gibt es einige Anhaltspunkte, den Ursprung der Zellen in Kultur als Parenchymzellen-spezifisch festzulegen. Die Zellen lassen sich durch ihre Form und Größe, die Zahl ihrer möglichen Zellkerne, durch ihre ultrastrukturellen Besonderheiten von Nichthepatozyten unterscheiden, im Zellverband zeigen sie Strukturen, die an Gallecanaliculi erinnern

(4, 17). Je nach den Kulturbedingungen bilden die Zellen eine einschichtige Zellage mit epitheloidem Aufbau, der lichtmikroskopisch einer normalen Leber gleicht (8, 9, 10), oft umgeben von völlig anders aussehenden Zellen, die meist als Fibroblasten erkannt werden. Leberzellen von 3 - 5 Tage alten Ratten zeigen sogar teilweise einen trabekulären Aufbau ihrer Zellverbände (12). Die meisten der bereits oben erwähnten biochemischen Reaktionen können als leberzellspezifisch auch unter Kulturbedingungen nachgewiesen werden (4, 5, 9, 11, 17, 23, 33). In ihrem Proliferationsverhalten zeigen Leberzellen adulter, unbehandelter Tiere auch in Kultur ein Verhalten wie in vivo: sowohl die DNA-Syntheserate mit 1,5% wie auch die Mitoserate (0,9%) sind in solchen Kulturen zu vernachlässigen (4, 9, 11, 17, 34). Nach entsprechenden Stimulationsreizen zeigen bis zu 30% der Hepatozyten eine gesteigerte DNA-Syntheserate, vergleichbar den in vivo ermittelten Werten, 20 Stunden nach Hepatektomie (11, 34). Die Hepatozyten scheinen sich also in vieler Hinsicht von Fibroblasten und anderen nicht-parenchymalen Zellen zu unterscheiden, offensichtlich treten aber in Kultur auch verschiedene Arten von Hepatozyten auf, die sich in ihrer Funktion, ihrer Ultrastruktur, ihrem Proliferationsverhalten und wahrscheinlich auch in ihrem Ursprung unterscheiden. So können Hepatozyten adulter Tiere mit ^{3}H-Thymidin markiert werden, sie durchlaufen jedoch nur ganz wenige Zellzyklen (10). Gleichzeitig mit den Hepatozyten werden aber auch andere epitheloide Zellen markiert, die eine hohe Proliferationsrate zeigen, viele Zellzyklen durchlaufen und zur Klonbildung fähig sind. Diese "Leberepithelähnlichen Zellen (10) verfügen auch über eine begrenzte Anzahl leberspezifischer, biochemischer Funktionen, sie sind untereinander (fest) verbunden, bilden in vitro einschichtige Zellagen mit Gallecanaliculi-ähnlichen Strukturen zwischen den Zellen, sie sind jedoch in ihrem Cytoplasma wesentlich einfacher strukturiert als normale Hepatozyten in vivo oder in vitro, sie weisen in ihrem Cyto-

plasma deutlich weniger Zellorganellen auf. Außerdem stellen sie auch, wie nachgewiesen werden konnte, keine degenerative Form von Hepatozyten dar (10).

In engem Zusammenhang mit der Erforschung der hier nur kursorisch und unvollständig dargestellten physiologischen Funktionen und Proliferation der Leber stellt, wie schon eingangs erwähnt, die Leber aufgrund ihrer hohen regeneratorischen Potenz ein wichtiges Modell zur Untersuchung der Proliferation und deren Beeinflußung dar. Gerade aber die Differenziertheit und das differente Verhalten der Leberzellen macht es weitgehend unmöglich, eindeutige funktionelle oder biochemische Aussagen über den Ablauf der Proliferation bzw. deren Beeinflußbarkeit zu machen. So wurde der Versuch unternommen, Leberzellen durch verschiedene Manipulationen bezüglich ihres Zellzyklusverlaufes zu synchronisieren. Nach 2/3-Hepatektomie ist in vivo die Zahl der Leberzellen, die sich gleichzeitig in der DNA-Synthese befinden, zu keinem Zeitpunkt größer als 30 - 40%, abhängig vom Alter der Versuchstiere (11, 27, 36). Auch in vitro wird nach 2/3-Hepatektomie ein Anteil von ca. 30% DNA-synthetisierender Zellen erreicht, der hier insbesondere vom Zeitpunkt der Zellisolation abhängig zu sein scheint.

Um bessere quantitative Aussagen machen zu können, wird versucht, die Zahl der Zellen, die in vivo eine DNA-Synthese ausführen, dadurch zu erhöhen, daß der Beginn der DNA-Synthese durch verschiedene Substanzen verzögert wird. Hydroxyharnstoff (HU) erweist sich dabei als ein effektiver Blocker der nucleären DNA-Synthese sowohl in vivo als auch in vitro (40, 41), ohne blockierende Wirkung auf die mitochondriale DNA-Synthese zu zeigen (37, 38, 39). Die Wirkung von HU auf die DNA-Synthese ist bei verschiedenen Zellarten erforscht worden. Bei Säugetierzellen und Bakterien wird das Wachstum durch Interferenz von HU mit der DNA-Synthese verhindert (42). Bei Hela-Zellen hemmt HU die Inkorporation von Thymi-

din in die Kern-DNA ohne nennenswerten Effekt auf den Einbau von Uridin und Leucin in RNA und Protein (40). In Extrakten von Knochenmark kommt es durch HU nicht zu einer Umwandlung der Ribonucleotide zu Desoxyribonucleotiden (44). Auf DNA-synthetisierende Zellen chinesischer Hamster hat HU eine selektive letale Wirkung (41). Bei Mäusefibroblasten wird die DNA-Synthese durch Blockierung der Ribonucleotidreduktase reversibel verhindert. Gleichzeitig wird bei diesen Zellen eine Synchronisation der DNA-Synthese von ca. 70% gefunden (47).

Auch bei regenerierenden Rattenleberzellen konnte die Blokkierung der DNA-Synthese nachgewiesen werden. Die Hemmung der DNA-Synthese durch HU bei 2/3-hepatektomierten Ratten ist reversibel (45, 48, 49). Auch bei Rattenleberzellen zeigt HU keinen meßbaren Effekt auf die RNA- und Proteinsynthese. Die Hepatotoxizität ist gering (50). Ein Modell zur subtotalen Synchronisation der DNA-Synthese von Leberzellen adulter Ratten wurde von RABES und Mitarbeitern entwickelt: eine kontinuierliche HU-Infusion über 25 Stunden nach einer 2/3-Hepatektomie bewirkt in vivo eine Synchronisation von etwa 90% der Zellen in der S-Phase. Das Intervall zwischen Beendigung der HU-Infusion und dem Beginn der DNA-Synthese hängt hierbei von der Dauer der HU-Behandlung ab (93).

Die damit erstmals erreichte subtotale Synchronisation einer Funktion der Leberzellen, hier die DNA-Synthese, macht das Modell der Leberzelle geeignet für die Untersuchung der Interaktionen zwischen Carcinogenen und replizierender DNA (94). Entscheidend für die Beurteilung der Wirkung des Carcinogens ist die genaue Kenntnis des zeitlichen Ablaufs der einzelnen Zellzyklusphasen nach der subtotalen Synchronisation, worüber bereits für das in-vivo-Modell umfangreiche Daten vorliegen.

Für die hier vorliegende Arbeit wurde die Aufgabe gestellt, in-vitro-Untersuchungen über den Verlauf der DNA-Synthese

nach subtotaler Synchronisation der Leberzellen durchzuführen. Zugrunde lag die Fragestellung, ob eine DNA-Synthese auch in vitro abläuft und die in vivo gemachten Beobachtungen über den Verlauf der DNA-Synthese in vitro zu reproduzieren seien. Dazu wurden die Leberzellen in vivo subtotal synchronisiert und anschließend isoliert. Ihre DNA-Synthese in vitro wurde mit den Methoden der Autoradiographie, Scintillationsmessung und Impulscytophotometrie gemessen, um eine quantitative Aussage über das Proliferationsverhalten der Zellen in vitro machen zu können.

2. Hauptteil:

2.1 Material und Methode

Es wurden für alle Versuche männliche Wistar Ratten eigener Zucht mit einem mittleren Gewicht von 200 gr verwendet. Die Tiere wurden in Macrolonkäfigen bei normalem Tag-Nacht Rhythmus gehalten. Als Futter erhielten sie Altromin-Standard-Diät (Altromin, Lage, Lippe) und Wasser ad libitum. Die Hepatektomie wurde an den Tieren in Äthernarkose nach der Methode von Higgins und Anderson (1932) durchgeführt. Der Operationszeitpunkt lag für alle Versuche in den späten Nachmittags- bzw. frühen Abendstunden (16 - 20 Uhr), um die circadianen Schwankungen der Proliferation gleichzuhalten.

2.1.1. Hydroxyharnstoff - Infusion

Die 25-stündige HU-Dauerinfusion wurde nach der von Iseler entwickelten Methode der Schwanzveneninfusion durchgeführt (80). Jedes Tier erhielt zunächst 14 Stunden nach Hepatektomie eine seinem Gewicht entsprechende einmalige Bolusinjektion von 0,142 gr HU/kg KG, gelöst in 0,8 ml steriler Kochsalzlösung (0,9% NaCl). Damit wird schnell ein wirksamer Plasmaspiegel von HU erreicht.

Die unmittelbar anschließende HU-Dauerinfusion wurde mit einer HU-Konzentration von 0,095 gr HU/kg KG/Stunde durchgeführt.
Für die Dauer der Präparation und Punktion der Schwanzvene (Venofix 0,5, Braun-Melsungen) erhielt die Ratte eine kurzfristige Äthernarkose. Mittels eines Perfusors (Braun-Melsungen) konnte die Infusionsrate für jedes Tier über 25 Std. konstant bei 0,56 ml/Std. gehalten werden.
Erst unmittelbar vor Infusionsbeginn wurden entsprechend dem mittleren Körpergewicht der für einen Versuch hepatektomierten Tiere 2 Stammlösungen für die einmalige Injektion und die anschließende Dauerinfusion mit steriler eiskalter NaCl (0.9%) und HU (Hydroxyurea, reinst, Serva, Heidelberg, Molekulargewicht: 76,1) hergestellt. Durch eine weitere Verdünnung der Stammlösungen mit steriler physiologischer Kochsalzlösung ließ sich für jedes Tier die seinem tatsächlichen Gewicht entsprechende HU-Konzentration als auch das für die HU-Dauerinfusion benötigte Infusionsvolumen bei einer Infusionsrate von 0.56 ml/Std. erreichen.
Während der Infusion bekamen die Tiere nur Wasser ad lib.. Nach eigenen Beobachtungen konnte durch den Entzug von fester Altrominnahrung ein stärkerer Wasser- und Elektrolytverlust über den Darm verringert werden.
25 Stunden nach Infusionsbeginn wurden nur solche Tiere weiter verwendet, bei denen ein perivenöser Austritt der HU-Lösung an der Einstichstelle weitgehend ausgeschlossen werden konnte.

2.1.2 Leberperfusion

.1.2.1 Übersicht der verschiedenen Perfusionsmethoden

Primär wurde versucht, Leberzellen aus ihrem Organverband zu lösen. Die so gewonnenen Zellen zeigten aber irreversible Veränderungen ihrer Feinstruktur und eine Einschränkung

ihrer Fähigkeit zu bestimmten biochemischen Leistungen durch den Verlust von glykolytischen Enzymen nach Störung der Permeabilitätsbarriere der Zellmembran (52, 53). Diese Störung der Zellmembranpermeabilität stellt, wie elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, ein zentrales Problem der Zellisolation dar (53, 60). Auch die Versuche der Perfusion mit Ca^{++}-Chelatoren, wie Na-citrat in Ca^{++}-freier Locke-Lösung (84) oder mit hyperosmolarer, alkalischer Salzlösung (60, 84) und die Digestion von Leberstücken in Tetraphenylboron (54, 60) brachten keine befriedigenden Ergebnisse. Verschiedene Enzyme, wie Lysozym (62, 63), Trypsin für fetales und neugeborenes Lebergewebe, oder eine Kombination aus Trypsin mit Collagenase und Hyaluronidase für adultes Lebergewebe (60) verbesserten die Ergebnisse.
Von den verschiedenen Enzymen scheint die Kombination von Collagenase und Hyaluronidase (53, 57, 60, 66, 67, 72, 74) oder Collagenase allein (68, 79) bei der Leberperfusion die besten Ergebnisse zu liefern.
Die erste Leberzellisolation mit diesen beiden Enzymen wurde von Howard und Mitarb. (66) in einem Schüttelsystem durchgeführt. Die isolierten Zellen zeigten elektronenmikroskopisch eine intakte Zellmembran, waren fähig, in Anwesenheit von Ca^{++} Sauerstoff aufzunehmen und waren Trypanblau-negativ. Der Zellgewinn betrug jedoch nur 5% des ursprünglichen Lebergewebes. Durch kontinuierliche Leberperfusion in situ mit einem Perfusionssystem konnten Berry und Friend 50% der Leberzellen isolieren (53). Die Zellvitalität betrug 95 - 98%.

Durch Modifikationen dieser Methoden konnten noch bessere Ergebnisse hinsichtlich der Feinstruktur der Zellen, ihres Gehaltes an K^+ und ihrer respiratorischen Aktivität erreicht werden (67). Eine Modifikation der Methode hat Seglen mit der 2-Stufenperfusion beschrieben: Entfernung von Ca^{++} aus dem Bindegewebe durch eine schnelle Vorperfusion mit Ca^{++}-freier Lösung und daran anschließend eine Perfusion mit Collagenase (von Clostridium histolyticum, 0,32 U/mg, ≙ 216 Mandl U/mg, Serva, Heidelberg) unter Zugabe von Ca^{++}, wo-

mit die Enzymdigestion günstig beeinflußt werden konnte (79). Die Zahl der intakten Zellen konnte durch diese 2-Stufenperfusion im Vergleich mit anderen Methoden wesentlich gesteigert werden.
Auch bei regenerierender Rattenleber scheint die Enzymperfusion mit Collagenase und Hyaluronidase gute Ergebnisse zu liefern, was Vitalität und Zellzahl betrifft (74).
Ausgehend von diesen guten, in der Literatur berichteten Ergebnissen wurde auch in der vorliegenden Arbeit als Isolierungsmethode die Enzymperfusion angewandt. Es wurde versucht, mit den vorhandenen Mitteln ein möglichst einfaches und effektives System zu entwickeln, um maximal viele und intakte Hepatozyten von hepatektomierten Ratten zu erhalten. Für die Isolation lagen dabei die entscheidenden Punkte in der Anzahl der isolierten Zellen sowie deren Intaktheit, die mit dem Trypanblau-Index bestimmt wurde. Ferner sollte die mechanische Manipulation auf ein Minimum reduziert werden, um die ohnehin schon beeinträchtigten Hepatozyten vor weiteren schädigenden Faktoren zu schützen.

2.2. Technische Vorbereitungen, Perfusionslösung

Für die Perfusion wurde folgende Lösung verwendet:

Ca^{++}-Mg^{++}-freie Hanks-Lösung:

NaCl	8 gr
KCl	0,4 gr
Na_2HPO_4	0,06 gr
KH_2PO_4	0,06 gr
Glucose	1,0 gr
Hepes	2,4 gr

mit aqua bidest. auffüllen auf 1000 ml und mit 1n NaOH einstellen auf pH 7,4

Vorperfusion: 170 ml Ca^{++}-Mg^{++}-freie Hanks-Lösung wurde steril in eine Infusionsflasche abgefüllt, das pH mit steriler 1n NaOH auf 7,4 eingestellt.

Enzymperfusion: In 100 ml Ca^{++}-Mg^{++}-freier Hanks-Lösung mit einem pH von 7,4 wurden 50 mg Collagenase gelöst.

Zur Perfusion selbst wurde eine einfache Insufionsflasche (250 ml) und eine Infusionsleitung (Braun-Melsungen) verwandt. Die Infusionsflasche wurde in einer Höhe von 50 cm über dem Tier befestigt. Die Injektion in die vena porta wurde mit einer Kunststoffbraunüle (Braun-Melsungen; Nr. 0,5) durchgeführt. Die Ableitung der Enzymlösung aus der Leber erfolgte mit einem ca. 15 cm langen, sterilen Polyäthylen-Schlauch (Innendurchmesser 2 mm) in eine sterile, abgedeckte Petrischale. Die Perfusionslösung wurde fraktioniert in die Infusionsflasche zurückgegeben und rezirkuliert.

Aus einer Stahlflasche perlte reiner Sauerstoff in eine sterile Waschflasche, die mit sterilfiltriertem aqua bidest. gefüllt war. Von dort gelangte der Sauerstoff mittels eines sterilen Polyäthylen-Schlauches durch die Druckausgleichsöffnung an der Luftschleuse des Infusionsbesteckes, wo er die Infusionslösung durchströmte. Die Entstehung eines Überdruckes konnte durch eine Punktionsnadel verhindert werden, deren Spitze den Flüssigkeitsspiegel überragte und durch die der Sauerstoff wieder nach außen treten konnte.

Temperaturregelung: Alle Lösungen wurden auf 37°C vorgewärmt. Während der Perfusion wurde die Perfusionsleitung in Schlingen durch ein Wasserbad mit einer Temperatur von 38°C geleitet. Die Petrischale, in der die Enzymlösung für die Rezirkulation aufgefangen wurde, stand ebenfalls in einem Wasserbad mit derselben Temperatur. Auf diese Weise konnte die zirkulierende Perfusionslösung nahezu konstant auf 36°C gehalten werden.

2.1.3. Eigene optimierte Perfusionsmethode

Abgesehen von einigen Versuchen, die Leberperfusion nach Beendigung der HU-Dauerinfusion ganz in vitro an der schon isolierten Leber durchzuführen, was sich aber bei den vorgegebenen Versuchsbedingungen als nicht durchführbar erwies,

wurde bei allen ausgewerteten Versuchen die Perfusion in situ und in zwei Schritten durchgeführt.

Vorperfusion: Es wurden 170 ml Ca^{++}-Mg^{++}-freie Hanks-Lösung mit einem pH von 7,4 schnell vorperfundiert. Dadurch sollte die Leber weitgehend entblutet werden, durch die Ca^{++}-freie Lösung das intrazelluläre Ca^{++} entfernt werden, was den Effekt der nachfolgenden Enzymperfusion zu erhöhen scheint (30, 53, 77, 78, 79). Die Dauer der Vorperfusion betrug durchschnittlich 8 Minuten, entsprechend einer mittleren Flußrate von 23,0 ml/min. und wurde ohne Rezirkulation durchgeführt.

Für die Enzymperfusion wurde Collagenase verwandt. Zusätzliche Enzyme wie Hyaluronidase scheinen die Wirkung der Collagenase eher zu vermindern (68, 79). Die Collagenasekonzentration betrug 0,05% in Ca^{++}-Mg^{++}-freier Hanks-Lösung, höhere Konzentrationen haben offenbar schädigende Wirkungen auf die Zellmembranen (66). Die mittlere Enzymperfusionsdauer lag bei 25 min. mit einer mittleren Perfusionsrate von 7,4 ml/min.. Dabei flossen insgesamt 180 - 190 ml Enzymlösung durch die Rattenleber. Bei guter technischer Beherrschung konnte die Perfusion von einer Person in ca. 45 min. durchgeführt werden. Insgesamt wurden 180 - 190 ml Perfusionslösung im rezirkulären System verwendet.
Nach dem Abhängen der Infusion wurde die mit Äther narkotisierte Ratte auf einer Arbeitsplatte in Rückenlage mit Klammern an den vier Extremitäten fixiert . Mit 70%igem Alkohol wurde die Ventralseite des Tieres gründlich desinfiziert. Mit der Schere wurde das Abdomen durch Medial- und Lateralschnitte breit eröffnet, um eine Kontamination der Bauchhöhle mit den Haaren des Tieres zu vermeiden. Der Darm wurde in toto seitlich luxiert, soweit es das Mesenterium zuließ. Die vena cava inferior, die hierbei sichtbar wurde, wurde unmittelbar oberhalb der einmündenden Nierengefäße mit einem sterilen Faden locker angeschlungen, ebenso die vena porta, wobei hinsichtlich der Lage des Fadens ein Kompromiß eingegangen werden mußte: Eine große Entfernung der Schlinge vom

Leberhilus ermöglichte eine gute Befestigung der Infusionsbraunüle, hatte aber einen retrograden Austritt von Perfusionslösung in das Perivasal- und Omentumgewebe zur Folge. Die dabei auftretenden, nicht unerheblichen Verluste an Enzymperfusionslösung konnten verhindert werden, wenn die Schlinge möglichst nahe am Leberhilus angelegt wurde.

Wenn die Narkose bereits das Excitationsstadium überschritten hatte, wurde mit einem Längsschnitt parasternal der Brustkorb eröffnet, wobei darauf zu achten war, daß keine größeren Gefäße im Thorax verletzt wurden. Die vena cava inferior wurde dicht oberhalb des Zwerchfells locker angeschlungen. Vorsichtig wurde nun mit einer anatomischen Pinzette die vena porta gefaßt und die Braunüle, die mit dem luftblasenfrei gefüllten Infusionsbesteck verbunden war, durch die Schlinge so weit eingestochen, bis die Nadelspitze vor der Aufzweigung der einzelnen Portalgefäße lag. Dies konnte durch das blutleere Gefäß gut beurteilt werden. Es sollte damit verhindert werden, daß das Lebergewebe unvollständig durchgespült würde. Sobald die Nadel nun in einer sicheren Position lag, wurde die Metallführungsnadel entfernt, das Infusionssystem direkt mit der Kunststoffbraunüle verbunden und diese mit dem bereit liegenden Faden fixiert; anschließend wurde die vena cava inferior oberhalb der Niere abgebunden. Dies erwies sich als notwendig, da sonst die Perfusionslösungen zum Teil in die Nieren und weiter retrogard abfließen konnten.
Es wurde dann mit einer sehr langsamen Vorperfusionsrate begonnen. Die anfängliche Geschwindigkeit konnte durch die Geschwindigkeit der Tropfenfolge im Ansatzstück der Infusionsleitung fein dosiert werden. Eine anfangs langsame Tropfenfolge war sehr wichtig, denn nur dann konnte die Leber gleichmäßig entbluten, ihre Farbe von dunkel bis zur hellgelben Eigenfarbe gleichmäßig über das ganze Organ hin ändern. Sobald dieser Farbumschlag begann und zusätzlich eine beginnende Schwellung des Organs beobachtet wurde,

wurde mit einer Schere der rechte Herzvorhof breit eröffnet. Die Perfusionslösung konnte nun frei abfließen. Die Leberschwellung ging sofort zurück, gleichzeitig wurde die Infusionsleitung ganz geöffnet (Vorperfusionsrate 23,0 ml/min.). Während der Dauer der Vorperfusion änderte die Leber ihre Farbe immer mehr in Richtung ihrer Eigenfarbe. Die aus dem rechten Vorhof strömende Perfusionslösung war anfangs rötlich und wurde dann immer klarer. Noch während der Vorperfusion wurde ein steriler Polyäthylenschlauch durch den rechten Vorhof in die vena cava inferior bis auf Höhe des Zwerchfells vorgeschoben und mit zwei Knoten sicher fixiert. Sobald die Vorperfusionslösung durchgelaufen war, jedoch noch bevor Luftblasen in die Infusionsleitung eintreten konnten, wurde mit einer sterilen Record-Spritze (20 ml) die auf 37°C vorgewärmte Enzymlösung durch die Druckausgleichsöffnung der Infusionsleitung in die Infusionsflasche gegeben. Die Perfusionsrate wurde nun verlangsamt (6 - 8 ml/min.). Sobald die gelbliche Flüssigkeit der Enzymlösung die Leber erreicht hatte, wurde der Schlauch, der aus der vena cava inferior, oberhalb der Leber kam, in eine abgedeckte, sterile Petrischale geleitet. Diese Petrischale stand etwas unterhalb des Leberniveaus am Kopf des Tieres, so daß die Perfusionsflüssigkeit gut abfließen konnte. Durch ein Wasserbad konnte auch die aufgefangene Enzymlösung auf einer Temperatur von ca. 36°C gehalten werden. Aus dieser Petrischale wurde mit einer sterilen Spritze die aufgefangene Enzymlösung zurück in die Infusionsflasche gegeben. Auf diese Weise konnten mit relativ geringen Mengen der Enzymlösung lange Enzymperfusionszeiten bei einer guten Perfusionsrate erreicht werden.

Durch Beobachtung der Tropfenfolgen sowohl in der Luftschleuse am Anfangsteil der Infusionsleitung als auch am Schlauchende, das in der sterilen Petrischale lag, konnte schon während der Perfusion der technische Erfolg teilweise beurteilt werden. War die Tropfgeschwindigkeit an beiden Stellen gleich, so floß wirklich die gesamte Enzymlösung durch die Rattenleber. Ging die Dauer der Enzymperfusion wesentlich über

25 Minuten hinaus, so entstanden Mikroläsionen im Bereich der Leberkapsel als auch der zu- und abführenden Gefäße, was auch unmittelbar bei der Punktion der vena porta auftreten konnte. Es trat dann unkontrollierbar Flüssigkeit von der Leberoberfläche und/oder aus den Gefäßwänden aus, die bisher trockene Bauchhöhle füllte sich mit Flüssigkeit, die Tropfengeschwindigkeit am Ausflußende nahm im Vergleich zu der in der Luftschleuse der Infusionsleitung deutlich ab. Es erschien daher nicht zweckmäßig, die Dauer der Enzymperfusion über 25 Minuten auszudehnen.

Nach Beendigung der Perfusion konnte der makroskopische Befund der Leber wie folgt beschrieben werden: Die Leber zeigt ihre hellgelbe Eigenfarbe gleichmäßig über das ganze Organ bis zu den Rändern hin. Bindegewebe, das von der Oberfläche in die Tiefe zieht, stellte sich als weißlich-graue Punkte auf der Oberfläche dar; größere grau-weiße Bezirke, wie sie bei den ersten Versuchen bei versehentlicher Infusion von Luftblasen oder bei anfangs zu schneller Infusion auftraten, wurden bei besserer technischer Beherrschung der Methode nicht mehr beobachtet. Das wichtigste Merkmal neben der Farbe war jedoch die weiche, völlig zerfließliche Konsistenz der Leber. Bei Limitierung der Perfusionszeit auf 25 Minuten schien die bindegewebige Leberkapsel intakt zu sein, es wurde kein Flüssigkeitsaustritt auf der Leberoberfläche beobachtet.

2.1.4. Zellisolation

Nährmedien und Kulturbedingungen

Für die Untersuchung der DNA-Synthese der Leberzellen wurde entsprechend den Angaben von RABES und Jantsch (12) folgendes Medium verwandt: Trockenpulver von TCM 199 (Difco) wurde in 1000 ml aqua bidest. gelöst und mit folgenden Zutaten versehen:

Glucose	4 gr
Lactalbumin	4 gr
Cholinchlorid	0,2 gr
Cystein	0,2 gr
Methionin	0, 02 gr
$NaHCO_3$	0,35 gr
Hepes	2,4 gr
Streptomycin	0,05 gr

Das pH wurde auf 7,4 eingestellt.

Diese Stammlösung wurde sterilfiltriert und in kleinere Portionen verteilt bei $+4^{o}C$ aufbewahrt. Vor jedem Versuch wurden auf 100 ml der Stammlösung noch folgende Zusätze hinzugefügt:

Kälberserum	25 ml
Embryonalextrakt	6,25 ml
Insulin	100 IE
ATP	0,625 mg

Das Medium wurde auf $37^{o}C$ erwärmt.

Zur Bestimmung des Trypanblau-Index wurden 25 mg Trypanblau (Serva) in 5 ml des für die Isolation benutzten Mediums gelöst und anschließend durch Filterpapier filtriert. Die Lösung wurde für jeden Versuch neu angesetzt und jeweils im Eisschrank unmittelbar bis zum Gebrauch aufbewahrt. Für die Filtration der Leber nach der Enzymperfusion wurde eine 4-schichtige Lage von Baumwollgaze über einem 30 ml-Erlmeyerkolben befestigt. Diese Filter wurden ebenso wie alle anderen Glaswaren und Instrumente heißluftsterilisiert.

Nach Beendigung der Perfusion wurde die Leber mit sterilen Instrumenten sehr vorsichtig aus dem Tier herauspräpariert. Ösophagus, Magen und Darm wurden nach Möglichkeit nicht verletzt. Die Ligamente, mit denen die Leber mit diesen Organen und dem Zwerchfell verbunden war, wurden sorgfältig und restlos durchtrennt. Auf diesen Punkt mußte besonderer Wert gelegt werden, da sonst beim Herausnehmen der Leber die Kapsel

des Organs zerrissen wäre und aus dem sehr weichen Organ sich die Zellen in die Bauchhöhle des Tieres ergossen hätten. Das unverletzte Organ wurde in eine sterile Petrischale gelegt. Von diesem Punkt an wurden die übrigen Präparationen in einer Laminar Flow Sterilarbeitsbank durchgeführt, wodurch die Kontamination mit Luftkeimen verhindert wurde. Mit warmem Medium wurde die Leber zweimal gewaschen, um Blutkoagel von der Oberfläche zu entfernen. Noch sichtbares Bindegewebe des Leberhilus und der Ligamenta wurde sorgfältig abpräpariert. Der von der Hepatektomie verbliebene nekrotische Leberstumpf wurde großzügig im noch vitalen Gewebe abgesetzt. In einer neuen, sterilen Petrischale wurde nach Zugabe von frischem Medium mit zwei Pinzetten die Organkapsel der einzelnen Lappen vorsichtig eröffnet. Durch leichte Schüttelbewegungen konnten die Leberzellen aus dem Organ isoliert werden. Auf mechanische Manipulationen, die eventuell weitere Leberzellen aus den Bindegewebssträngen herausgelöst hätten, konnte angesichts der ausreichenden Zellzahl verzichtet werden. Die größten Bindegewebsstränge wurden mit der Pinzette entfernt, die Zellsuspension anschließend mit einer weitlumigen Pipette durch die sterile 4-schichtige Lage aus Baumwollgaze filtiert. Die durchgelaufene Zellsuspension wurde für einige Minuten stehengelassen, bis der größte Teil der Zellen ein deutlich sichtbares Sediment bildete. Nach ausreichender Sedimentierung wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert, und das Sediment, je nach Bedarf mit frischem Medium auf 30 - 50 ml aufgefüllt.

Von dieser Zellsuspension wurde dann das weitere Untersuchungsmaterial angefertigt. Bei guter technischer Beherrschung dauerte die Zellisolierung ab Beginn der Leberperfusion bis zum Zeitpunkt, da die einzelnen Proben hergestellt waren, 70 - 75 Minuten.

2.2. Untersuchungsmaterial

2.2.1 Vitalfärbung, Zellzählung, unmittelbare Ausstriche

Von der endgültigen Zellsuspension wurde die Vitalität doppelt bestimmt. Je acht Tropfen der gut gemischten Zellsuspension wurden mit zwei Tropfen einer frisch angesetzten Trypanblau-Lösung für 5 Minuten in Zentrifugengläschen inkubiert. Nach 5 Minuten wurde von beiden Proben ein Nativpräparat angefertigt und unter dem Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung ausgezählt. Nur die Zellen, deren Kerne und Zytoplasma eindeutig nicht gefärbt waren, wurden als Trypanblau-negativ gewertet.
Auch die Zellzahl wurde als Doppelwert bestimmt. Eine Neubauer-Zählkammer wurde von beiden Seiten mit der Zellsuspension gefüllt. Es wurden 5 mittlere Quadrate ausgezählt, was einem Rauminhalt von 1/50 ul entspricht. Es wurde der jeweilige Wert pro ml Zellsuspension als Doppelwert bestimmt.

Von der endgültigen Zellsuspension wurden zwei Ausstriche angefertigt. Sie wurden nach Lufttrocknung in Äthanol-Eisessig (3:1) für 3 min fixiert und anschließend HE gefärbt.

2.2.2. Autoradiographie, Scintillationsmessung

Von der Zellsuspension wurden für jeden Versuchszeitpunkt drei sterile Zentrifugengläschen mit jeweils 1 ml Zellsuspension gefüllt. Durch vorsichtiges, gründliches Aufpipettieren der Zellsuspension bei Entnahme wurde sicher gestellt, daß in jedem Zentrifugengläschen annähernd dieselbe Zellzahl pro ml Suspension inkubiert wurde. Danach wurden alle Gläschen für etwa 15 sec mit O_2 begast und dann mit einem sterilen Gummistopfen fest verschlossen. Die Zentrifugengläschen wurden, je drei Gläschen zufällig einander zugeordnet, in einem Wasserschüttelbad bei einer Schüttelfrequenz von 60/min inkubiert. Im Abstand von 60 min wurden je drei Gläschen mit 3H-TdR markiert (5,5 uCi/ml Zellsuspension, 6-^{3}H-Thymidine, Radiochemical Centre Amersham Eng-

land, spez. Aktivität 5 Ci/mmol). Nach 30 min Inkubation wurden je zwei Gläschen für Scintillationsmessungen und 1 Gläschen für die Autoradiographie weiter verarbeitet.

Scintillationsmessung

Die Suspension wurde zweimal mit eiskalter Ca^{++}-Mg^{++}-freier Hanks-Lösung, welche mit inaktivem Thymidin versetzt war, gewaschen, um eine weitere Inkubation von ^{3}H-TdR zu stoppen und jeweils in einer Beckmann-Zentrifuge bei 1000 g für 5 min zentrifugiert. Zur DNA-Ausfällung wurden dem Sediment nach dem zweiten Waschen zu gleichen Teilen eiskalte Ca^{++}-Mg^{++}-freie Hanks-Lösung und 0,6 n Perchlorsäure zugegeben. Die Proben wurden 5 min bei 1000 g zentrifugiert, der Überstand abgegossen und erneut eiskalte 0,2 n Perchlorsäure zugegeben. Nach der letzten Zentrifugation wurde die ausgefällte DNA durch einen Glasfilter von 1 cm Durchmesser, in den ein rundes Filterpapier desselben Durchmessers eingelegt war, filtriert. Dieses Filterpapier mit den ausgefällten DNA- Rückständen, jeweils zwei pro Meßpunkt, wurde im Vacuumexsiccator getrocknet.
Die Filterpapiere wurden auf Platinspiralen befestigt und in Scintillationsmessgläschen mit Schraubverschluß, nach Einleitung von reinem O_2 für 20 sec, im geschlossenen System durch externe Lichtzündung verbrannt. Der hierbei entstehende radioaktive Wasserdampf wurde in einem Gemisch aus Aceton und Trockeneis kondensiert. Nach Zugabe von 10 ml Bray-Scintillator wurde die Radioaktivität in einem Packard-Scintilationsmessgerät (Modell Packard 2425) gemessen.

Autoradiographie

Für die Autoradiographie wurde ein Zentrifugengläschen mit Zellsuspension nach 30-minütiger Inkubation mit ^{3}H-TdR zweimal in eiskalter CMF-Hanks mit inaktivem Thymidin gewaschen und bei 500 U/min 5 min lang zentrifugiert. Vom Sediment wurde ein Ausstrich angefertigt. Nach Lufttrocknung wurden die Ausstriche in 10%igem Formol mit inaktivem Thymi-

din für 10 min fixiert. Anschließend erfolgte eine Wässerung in fließendem Leitungswasser für 24 Stunden, danach 3-maliges Wässern für je 1 Stunde in aqua bidest. mit inaktivem Thymidin. Die Ausstriche wurden mit einer Filmemulsion von Ilford (K2) beschichtet und im Dunkeln bei +4°C exponiert. Entsprechend dem Ergebnis von Probenentwicklungen wurden die Ausstriche nach 14 - 21 Tagen entwickelt, fixiert und anschließend HE gefärbt. Bei 1000-facher Vergrößerung wurden zur Bestimmung des Markierungsindex 1000 Zellen/Präparat ausgezählt.

2.3. Impulscytophotometrie

Neben der Autoradiographie und der Flüssigkeitsscintillationsmessung konnten an isolierten Leberzellen impulscytophotometrische Messungen durchgeführt werden. Da es sich um eine relativ neue Methode handelt, sollen hier Grundlagen der Methode und des verwendeten Gerätes (ICP 11, Phywe, Göttingen) sowie bei den Ergebnissen die Auswertungsmethoden erörtert werden.
Schon im Jahre 1936 konnte der Gehalt derZellen an Nucleinsäuren durch Messung ihrer Ultraviolett-Absorption bestimmt werden (Caspersson). Im sichtbaren Spektralbereich wurden diese Messungen vor allem von Sandritter und Mitarbeitern weiterentwickelt (1956). Die Messungsgeschwindigkeit und damit auch die statistische Genauigkeit der Ergebnisse blieb jedoch gering, da jede Zelle einzeln im Mikroskopphotometer unter Sicht eingestellt und gemessen werden mußte (Literaturübersicht bei 85). Eine Erhöhung der Messgeschwindigkeit konnte mit der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen und durch die Anwendung des Durchflußverfahrens erreicht werden.

Fluorochromierung

Im Prinzip werden chemisch definierte Bestandteile der Zellen (z.B. Nucleinsäuren und Proteine) mit für sie spezifischen Fluorochromen gefärbt. Meist ist die Eigenfluoreszenz der verwendeten Fluorochrome im Vergleich mit der dann einzu-

gehenden Verbindung gering. Die fluoreszenzcytophotometrischen Bestimmungen beruhen dann auf der Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes und lassen sich vereinfacht auf die Formel

Substanzgehalt = Fluoreszenzintensität x Fläche x Konstante

bringen (86). Für die hier interessierende DNA-Bestimmung wurden verschiedene Farbstoffe eingesetzt:

Feulgenfärbung (Kamentsky)
Acridin Orange
Schiffsches Acriflavin (Sandritter)
Ethidiumbromid (Dittrich/Göhde)

Dieser zuletzt genannte Farbstoff wurde in der hier vorliegenden Arbeit bei den Messungen am ICP verwandt (Übersicht bei 85/87).
Ethidiumbromid bildet mit Nucleinsäuren einen stark fluoreszierenden Komplex, eine Reaktion, deren Selektivität durch verschiedene, weiter unten zu erwähnende Verfahren DNA-spezifisch erhöht werden kann.
Die entscheidende Reaktion scheint zu sein, daß Ethidiumbromid sich in der Doppelhelix, vorwiegend im hydrophoben Bereich, anlagert. Die Reaktion verläuft als Ionenreaktion, ist reversibel, pH- und konzentrationsabhängig (88, 89, 90, 91). Wahrscheinlich erfolgt bei der Färbung durch Bindungskräfte zwischen Farbstoff und Zellinhaltsstoff eine Konzentration des Farbstoffes(89). Die Fluoreszenz des auf diese Weise gebundenen Ethidiumbromids ist wesentlich höher als die des freien Farbstoffes (91).

Durchflußverfahren

Das technische Prinzip aller zur Zellzahl- und Größenbestimmung (erstmals Coulter 1956) oder zur Bestimmung von Zellinhaltsstoffen (Van Dilla 1969) entwickelten Geräte wurde erstmals von Crosland und Taylor 1953 beschrieben.

Die Zellen werden mittels eines feinen Flüssigkeitsstromes, sei es durch einen engen Kanal oder als Jet-Strom von Luft umgeben, durch eine Meßpore von meist 75 - 100 µ, die zugleich die Meßebene darstellt, befördert. In dieser Meßebene wird, je nach Gerät, Größe und Zahl der Zellen durch Spannungsänderung (Prinzip Coulter) oder die Fluoreszenzintensität der einzelnen Partikel gemessen. Dieses Prinzip wurde in verschiedenen Modifikationen weiterentwickelt und verbessert, die verschiedenen Meßmethoden wurden auch miteinander kombiniert, um bei einer Messung möglichst viele Informationen über ein und dieselbe Zelle zu erhalten. So können heute von einer Zelle Volumenbestimmungen (low-angle-forward-light-scatter), Fluoreszenz von Inhaltsstoffen bei einer oder mehreren Längenwellen des Erregerlichtes (meist Laserstrahlen) und morphologische Untersuchungen (slit-scanning) durchgeführt werden. Gleichzeitig können die Zellen entsprechend der erhaltenen Information durch Ablenkung im elektrostatischen Feld getrennt werden (cell sorting), (Literaturübersicht bei 92).

Das von der Firma Phywe in Göttingen in Zusammenarbeit mit Dittrich und Göhde entwickelte Impulscytophotometer, das bei der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, soll nun in seinem Aufbau, seiner Funktion und auch in seinen Schwierigkeiten beschrieben werden.
Das Gerät kann im wesentlichen in zwei große Teile aufgeteilt werden:

Teil A: Das eigentliche Meßgerät mit Meßkammer, Objektiv, Photomultiplayer, Quecksilberhochdrucklampe zur Fluoreszenzerzeugung und Rollerpumpe für den Flüssigkeitsstrom.

Teil B: Elektronischer Teil mit Vielkanalanalysator, Oszillographen zur unmittelbaren Sichtkontrolle, Einstellungsmöglichkeiten und angekoppeltes Schreibgerät zur graphischen Darstellung der Ergebnisse.

Teil A: Die eigentliche Meßkammer bildet ein horizontaler Kanal, durch den ein Wasserstrahl als Transportstrom mittels einer Rollerpumpe befördert wird. In der Mitte am Kanalboden befindet sich die Meßpore mit einem Durchmesser von 100 µ, durch die der horizontale Flüssigkeitsstrom nach dem Prinzip der Saugstrahlpumpe die zu messende Flüssigkeit saugt. Das an der Meßpore vorbeigeflossene Wasser fließt in einen tiefer stehenden Auffangbehälter ab. Die Meßpore am Kanalboden liegt genau im Brennpunkt eines Objektives. Durch dieses kann die Meßpore scharf eingestellt sowie auf Verunreinigungen geprüft werden. Außerdem tritt durch dieses Objektiv das durch spezielle Filter auf die geeignete Wellenlänge gebrachte Licht hindurch und regt genau in der Ebene der Meßpore die gefärbten Zellen zur maximalen Fluoreszenz an. Die emittierte Zellfluoreszenz gelangt auf demselben Weg zurück durch das Objektiv auf den darüber angebrachten Photomultiplayer, der die Fluoreszenzintensitätsunterschiede in elektrische Signale umwandelt. Die elektrischen Signale werden an den elektronischen Teil B weitergeleitet.

Teil B: Die eingegangenen Signale werden je nach ihrer Höhe durch einen 128-Kanal-Vielkanalanalysator geordnet und Signale gleicher Höhe im gleichen Kanal gespeichert. Durch Vorwahl der "Counts" von 100 - 100 000 ist es möglich, festzulegen, wann bei Füllung eines Kanals mit der vorgewählten Counts-Signalzahl die Messung automatisch beendet werden soll. An einem Oszilographen ("result") kann sowohl während der Messung der Aufbau der DNA-Verteilungskurve, als auch nach Beendigung der Messung das DNA-Histogramm insgesamt beurteilt werden. An einem zweiten Oszillographen ("signal") können während der Messung die einzelnen Signale, ihre Form, Höhe und ihre Frequenz, sowie ihre Häufigkeit beobachtet werden. Ferner kann der Geräte-Background, dessen Anteil am Meßergebnis mit Hilfe einer "Level"-Einstellung festgelegt werden kann, an diesem Oszillographen abgeschätzt und zusätzlich eine Aussage getroffen werden, ob die in der

Suspension vorliegenden Zellen einzeln oder in größeren Verklumpungen durch die Meßpore treten. Dasselbe kann neben der optischen Kontrolle noch durch den "Pulse-Rate"-Anzeiger und dessen gleichmäßigen, ruhigen Verlauf während einer Messung kontrolliert werden. Dabei hängt die Anzahl der pro Sekunde durch die Meßpore getretenen Partikel bei idealer Einstellung von der Partikelgröße ab.

Es besteht bei dem verwendeten Gerät ferner die Möglichkeit, die Auflösung des Photomultiplayers entsprechend zu erhöhen und damit die Ergebnisse zu vergrößern, was der Objektivvergrößerung bei einem herkömmlichen Mikroskop entspricht. Durch 4 ansteigende Vergrößerungsstufen ("Amplification") ist es möglich, dicht beieinander liegende DNA-Klassen besser aufzulösen. Eine zusätzliche, wenn auch beschränkte Vergrößerung, ähnlich der Okularvergrößerung des Mikroskops ist durch die Erhöhung der "High-Voltage" möglich. Diese kann stufenlos in einem Umfang von 500 V in ansteigenden und sich überlappenden Bereichen (0 - 500, 250 - 750, 500 - 1000, 750 - 1250) verändert werden. In niedrigen Bereichen der "High-Voltage" kann durch deren Erhöhung zusätzlich eine bessere Auflösung der Kurven erreicht werden, was einer Auseinanderziehung der einzelnen DNA-Kurven entspricht. Jedoch resultiert gleichzeitig eine Verschiebung der Kurven in Richtung auf höhere Kanalnummern, also nach rechts auf der Abszisse, zusammen mit einer breiteren Streuung der einzelnen Kurven. Während die bessere Auflösung der Kurven nur auf niedrigeren HV-Bereich beschränkt ist, ist eine Verschiebung der Kurven zu höheren Kanalnummern bis zu den höchst möglichen Werten möglich, jedoch ohne weitere Spreizung der einzelnen Peaks. Neben der direkten Kontrolle der Veränderung der Meßergebnisse am Oszillographen kann die Veränderung der "High-Voltage" am Anzeigegerät "Average Illumination" abgelesen werden. Daneben kann auch mit dieser Anzeige die Beschaffenheit der Zellsuspension bezüglich Zellverklumpungen beurteilt werden. Es sei jedoch darauf hingewiesen, daß durch die Veränderunge der "High-Voltage", abzulesen an der Anzeige

"Average Illumination", nicht die Intensität der Fluoreszenz verändert wird, sondern die Empfindlichkeit des Vielkanalanalysators.
Die auf dem Oszillographen "Result" dargestellte DNA-Verteilungskurve kann mit einem geeigneten Schreibgerät auf ein spezielles Kurvenpapier übertragen werden. Der Schreiber kann so geeicht werden, daß eine lineare Ablesung des Signal-(Zell) Gehalts der einzelnen Kanäle möglich ist.

2.3.1. Gewinnung des Untersuchungsmaterials, Präparation der Zellproben, Einstellung des Gerätes

Impulscytophotometrische Messungen wurden von folgenden Versuchen durchgeführt: Parallel zu den Inkubationen für Autoradiographie und Scintillationsmessung wurde eine entsprechende Menge an Zellmaterial unter den gleichen Bedingungen inkubiert, jedoch ohne Inkubation mit radioaktivem ^{3}H-TdR. Eine zweite Meßreihe wurde durchgeführt, um einen Anhalt zu haben, welche Veränderungen im DNA-Gehalt an Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach 2/3-Hepatektomie zu erwarten wären. Die eigentliche Präparation für die ICP-Messung war für beide Versuchsreihen dieselbe.

Gleichzeitig mit den Zellsuspensionsproben für Autoradiographie und Scintillationsmessung wurde im 1-Stunden Abstand ein Inkubationsgläschen, das nicht radioaktiv markiert war, dem Schüttelbad entnommen, zweimal mit Ca^{++}-Mg^{++}-freier Hanks-Lösung gewaschen und bei 500 U/min für 5 min zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde der Bodensatz aufgeschüttelt und mit einer Pasteurpipette in 20 ccm Methanol unter ständigem Schütteln eingetropft. Durch das Schütteln sollten die Zellen möglichst einzeln im Methanol suspendiert werden. In dieser Form konnten die Proben in dicht verschlossenen Gläschen bei +4°C für mindestens zwei Monate ohne Veränderung aufbewahrt werden.

Veränderung des DNA-Verteilungsmusters bei Leberzellen nach 2/3-Hepatektomie in Abhängigkeit von der Zeit nach 2/3-Hepatektomie

Zum Vergleich mit Leberzellen nach Hepatektomie und Hydroxyharnstoff-Infusion wurden die DNA-Verteilungsmuster von Rattenleberzellen in verschiedenen Stadien untersucht. Dafür wurden folgende Tiere herangezogen: Ein Tier von 350 gr KG ohne Hepatektomie, ein Tier von 200 gr, was den bei den übrigen Versuchen verwendeten Versuchstieren im Gewicht entspricht, ebenfalls ohne Hepatektomie, weiterhin Tiere von 200 gr nach 2/3-Hepatektomie, deren Leberzellen in Zeitabständen von 3 - 72 Stunden nach Hepatektomie in der oben beschriebenen Methode isoliert wurden. Da die weiter unten berichteten Ergebnisse der Zellisolation nur für Tiere nach 2/3-Hepatektomie gelten, wurde bei den Tieren, deren Leberzellen ohne den Stimulationsreiz der 2/3-Hepatektomie isoliert werden sollten, dennoch unmittelbar vor Beginn der Perfusion eine 2/3-Hepatektomie durchgeführt mit sofort anschließender Enzymperfusion. Auf diese Weise konnten die technischen Angaben wie Enzymmenge und Perfusionsdauer auch bei diesen Versuchen gleichgehalten werden. Da die Zellen dieser Versuche nicht inkubiert zu werden brauchten, wurde die Zellisolation zwar auf dieselbe Weise wie oben beschrieben und durchgeführt, zur Isolation wurde jedoch nur physiologische NaCl-Lösungverwendet. Die Zellsuspension in NaCl wurde zusätzlich noch zweimal mit frischer NaCl gewaschen. Das Sediment wurde schließlich aufgeschüttelt und entsprechend der Zellzahl mit einer Pasteurpipette auf 4 - 5 Gläschen mit je 20 ccm Methanol unter kräftigem Schütteln zur Vermeidung von Verklumpungen verteilt (Dichte der Zellsuspension in Methanol ca. 10^6 Zellen/ml). Diese Zellproben konnten, wenn sie dicht verschlossen waren, für mindestens zwei Monate ohne Veränderung der Ergebnisse bei $+4^{\circ}C$ aufbewahrt werden.

Die eigentliche Präparation der Zellen für die Messungen am ICP wurden nach einem von der Firma Ohyue herausgegebenen Rezept durchgeführt. Eine Zellmenge von maximal 1×10^6 Zellen wurden aus dem Vorratsgefäß mit Methanol entnommen. Die Zellen wurden zweimal mit Trispuffer (pH 7,5) gewaschen und 5 min bei 1000 g zentrifugiert (Beckman Zentrifuge, Modell TJ 6), um das Methanol völlig zu entfernen. Anschließend wurden die Zellproben in den Zentrifugengläschen mit je 5 ml RNAse für 75 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut mit Trispuffer gewaschen und zentrifugiert, um dann mit Pepsin-HCL für 15 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert zu werden. Die Zellen wurden anschließend zweimal gewaschen, zentrifugiert und die Reagenzgläser mit 10 ml Ethidiumbromid-Lösung aufgefüllt. Nach 20 min Inkubation in Ethidiumbromid konnten die Zellen dann gemessen werden. Unmittelbar vor der Messung wurden die einzelnen Zellproben durch ein Nylonsieb mit einer Porenweite von ca. 70 μ gegossen, um gröbere Verunreinigungen wie Staubpartikel zu entfernen. Ohne Durchführung dieses Filtriervorganges, der eventuell mehrmals wiederholt werden mußte, konnte eine störungsfreie Messung nicht durchgeführt werden.

Für die Färbung der Zellen wurden folgende Lösungen verwendet:

Ethidiumbromidlösung: (Serva, Heidelberg)	10 mg Ethidiumbromid (3,8-diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiumbromid) in 1 l Tris-Puffer, pH 7,5, gelöst
Ribonucleaselösung: (Serva, Heidelberg; von Rinder-Pankreas, 100-Kunitz-Einheiten pro mg; 5x kristallisiert)	0,1 gr Ribonuclease in 100 ml aqua bidest. lösen. Begrenzte Haltbarkeit, daher jeweils geringe Mengen frisch angesetzt.
Pepsin-HCL-Lösung: (Merck, Darmstadt, 2500 FIP-U/gr = 35000 E/gr DAB 6)	14 mg Pepsin (35000 E/gr) in 100 ml 0,2%iger HCL gelöst

Tris-Puffer, pH 7,5: 12 gr Tris (hydroximethyl)-aminomethan, 6 gr NaCL, 84 ml 1 n HCL auf 1 l mit aqua bidest. aufgefüllt

Die Hg-Hochdrucklampe des ICP 11 mußte 30 min vor Meßbeginn gezündet werden. Zur Eichung des Gerätes wurden zwei verschiedene Zellarten verwandt. Zur Geräteeichung wurde ein Hühnererythrozytenstandard der Herstellerfirma herangezogen. Mit annähernd derselben Geräteeinstellung, mit der dann die eigentlichen Zellproben gemessen wurden, sollte anhand des Hühnererythrozytenstandards die richtige Einstellung der Meßpore und die optimale Justierung der Köhlerschen Beleuchtungseinrichtung überprüft werden. Die Meßpore konnte mit Hilfe zweier Rändelschrauben in horizontaler und vertikaler Richtung verstellt, die Köhlersche Beleuchtungseinrichtung in ihrer Brennweite verändert werden. Durch Veränderung dieser beiden Parameter konnte bei der Messung des Erythrozytenstandards ein möglichst schmaler und symmetrischer Peak erreicht werden.
Die Hühnererythrozyten wurden zur Geräteeichung herangezogen, da der DNA-Gehalt der einzelnen Zellen konstant ist. Dies zeigte sich bei optimaler Einstellung des Gerätes in einem einzigen, schmalen Peak auf dem Oszillographen. Es erwies sich als notwendig, diese Geräteeichung häufig, auch während der Messung der eigentlichen Zellproben, zu wiederholen.
Die zweite Eichung des Gerätes wurde mit einer Zellsuspension von Rattenthymocyten junger und erwachsener Tiere durchgeführt. Auch diese Zellen setzen sich in ihrem DNA-Gehalt aus einer konstanten Kernklasse zusammen. Da der DNA-Gehalt dem diploiden Chromosomensatz entspricht, konnte damit das Gerät so geeicht werden, daß der Peak der diploiden Zellen immer in demselben Kanal des Vielkanalanalysators zu liegen kam.
Im einzelnen wurde bei der Messung und Eichung wie folgt vorgegangen: Durch einen Beobachtungstubus konnte die Meß-

pore am Boden des Kanals, der zweckmäßigerweise immer von aqua bidest. durchströmt wurde, auf verunreinigende Fluoreszenzen überprüft werden. Der Kontrast zwischen Meßpore und Kanalboden sollte immer maximal sein. Neben der optischen Kontrolle der Meßpore konnte deren optimale Einstellung durch die konstant gleiche Anzeige der "Average Illumination" kontrolliert werden. Diese wird durch die "High Voltage" verändert, zeigt bei gleicher Einstellung jedoch unter optimalen Bedingungen immer den gleichen Ausgangswert (0,08 - 0,09). Bei Betätigung des Meßvorganges nur unter Wasserdurchfluß konnten Verunreinigungen durch leichten Anstieg der "Pulse Rate", den Aufbau eines oder mehrerer Peaks im Oszillographen, durch Auftreten von einzelnen Impulsen im Oszillographen "Signal" und durch den Anstieg der "Average Illumination" über den eben genannten Wert erkannt werden. War die Meßpore sauber, konnte unter folgender Einstellung des Gerätes mit der Messung bzw. mit der Eichung begonnen werden:

Amplification 10: Nur unter dieser Vergrößerung konnte eine genügende Auflösung der einzelnen Impulse erreicht werden.

Level 190: Die Höhe des Levels wurde so eingestellt, daß bei der Eichung mit Hühnererythrozyten und Rattenthymozyten der schmale und symmetrische Peak mit der kleinst möglichen Countzahl erreicht wurde. Jedoch sollte der Level nicht zu hoch eingestellt werden, um nicht Impulse in niedrigeren Kanälen abzuschneiden. Die Stärke des Gerätebackgrounds konnte am Oszillographensignal beobachtet werden. Die Höhe des hier angegebenen Levels konnte nur durch zahlreiche Versuchsmessungen empirisch ermittelt werden.

High Voltage 4,5 - 4,75 (entspr. 475 - 487,5 V): Wie schon erwähnt, bewirkte die Erhöhung der "High Voltage" neben einem geringen Vergrößerungseffekt eine Verschiebung und Spreizung der einzelnen Peaks nach rechts zu höheren Kanalnummern. Bei dem oben angegebenen Wert lag der Peak der ausschließlich diploiden Rattenthymozyten auf Kanal 25. Ein tetraploider

Peak bei Rattenleberzellen kam dann auf Kanalnummer 50, ein oktoploider auf Kanal 100 zu liegen. Bei dieser Einstellung lag der Peak der Hühnererythrozyten auf Kanal 9.

Counts 1K: Diese Vorgabe, bei der der Meßvorgang automatisch abgeschaltet wurde, wenn in einem Kanal 1000 Impulse gespeichert waren, schien unter Berücksichtigung des Material- und Zeitaufwandes der statistischen Genauigkeit zu genügen. Meist enthielt eine Zellkernprobe genügend Zellen, um mehrmals gemessen zu werden. Enthielt eine Zellprobe nur wenige Zellen, so konnte sie mit einer niedrigeren Countsvorgabe gemessen werden (100 oder 400). Waren bei Messung mit niedrigerer Countsvorgabe noch Zellen übrig, so konnte die Countszahl weiter erhöht werden und die Messung ohne Verlust der bisher registrierten Impulse fortgesetzt werden.

Während der Messung waren folgende Parameter zu beachten: Bei der Messung von Leberzellkernen sollte die "Impulse Rate" nicht über 500/sec liegen, der Zeiger der "Pulse Rate" während der Messung relativ ruhig liegen. Maximaler Ausschlag der allzugroßen Schwankungen während einer Messung zeigten eine Verstopfung der Meßpore an. Auch der Wert der "Average Illumination" sollte während der Messung konstant bleiben, bei Leberzellen 0,13 - 0,15. Auch hier zeigte ein höherer Ausschlag während des Meßvorganges eine Verstopfung der Meßpore an.
Am Oszillographen "Result" konnte schon während der Messung der Aufbau der Impulsverteilungsmuster verfolgt werden und nach Beendigung der Messung beurteilt werden. So waren bei Kurven mit mehreren Peaks gleichsinnige Veränderungen in allen Peaks wie einseitige Verbreiterungen nach rechts oder links, Auftreten von Schultern gleichseitig in den Peaks und dergleichen meist Zeichen einer nicht optimalen Lage der Meßpore. Dann mußte die Messung abgebrochen und das Gerät neu mit Hühnererythrozyten geeicht werden.

Am Oszillographen "Signal" konnte während der Messung mit der Häufigkeit der auftretenden Impulshöhen grob die Zu-

sammensetzung der Kernprobe abgeschätzt und durch das gleichmäßig dichte Frequenzmuster der Impulse die Qualität der Kernsuspension hinsichtlich Verklumpungen beurteilt werden.

Die Ergebnisse konnten nach Beendigung der einzelnen Messungen mittels eines Schreibers graphisch dargestellt werden. Die volle Höhe der Ordinate entsprach dabei der vorgewählten Countzahl; durch eine Vorschubgeschwindigkeit von 120 mm/sec und einer Abtastgeschwindigkeit von 1 Kanal/sec entsprach die ganze Abszisse genau den 128 Kanälen des Vielkanalanalysators. Alle Kanäle, deren Impulsinhalt unter 40% bzw. 10% lag, konnten durch ein nochmaliges Aufzeichnen dieser Kurvenbereiche vergrößert werden. Dazu wurde das graphische Papier erneut in 0-Position gebracht und die Countsvorgabe entsprechend auf "400" bzw."100" verändert. Dann wurden die interessierenden Bereiche zum zweiten Mal in einer 2,5 bzw. 10-facben Vergrößerung aufgezeichnet.

Der Vollständigkeit halber seien hier auch noch die bei der Messung mit dem Gerät aufgetretenen Schwierigkeiten erwähnt, deren Bedeutung für die Ergebnisse bei deren Darstellung und Diskussion erörtert werden soll.

Die Verstopfung der Meßpore durch Verunreinigungen oder Zellverklumpungen stellte ein sehr häufiges Problem dar. Allein durch sauberstes Arbeiten, durch häufige Filtration aller verwendeten Flüssigkeiten und der Kernsuspension konnte diese Störung in Grenzen gehalten werden. Bei Zellverklumpungen, deren Auftreten durch die schon oben erwähnten Anzeigen beobachtet werden konnte, brachte auch eine Behandlung der Suspension mit Ultraschall verschiedenster Dauer und Intensität, wie sie in der Literatur oft berichtet wird, keine eindeutige Verbesserung. Lediglich der Zellschutt, der ebenfalls registriert wird, nahm zu.
Durch ähnliche Veränderungen der Anzeigegeräte wie bei der Verstopfung der Meßpore muß ein Bruch des sehr empfindlichen Deckgläschens zwischen Objektiv und Meßkammer erkannt werden. Nur durch den exakten Zusammenbau der Meßkammer konnte

ein allzuhäufiger Bruch des Deckgläschens vermieden werden.

Keine befriedigende Lösung konnte für das Problem gefunden werden, daß beim Ansetzen der Meßkammer durch Eintauchen des Objektives in das Immersionsöl kleinste Luftbläschen im Immersionsöl auftreten. Dabei können mehrere kleinste Bläschen gerade unter der Frontlinse des Objektives konfluieren. Dies führt zu einer Verminderung der Intensitätsunterschiede von der Meßpore zu der Umgebung und damit zu einer Verschiebung der Histogramme nach **rechts.** Bei langdauernden Messungen entstand der Eindruck, daß das Auftreten der Luftbläschen mit zunehmender Verweildauer der Meßkammer am Objektiv zunahm.

3. Ergebnisse

3.1. Zellisolation

Es sollen hier zunächst die Ergebnisse der Zellisolationsmethoden dargestellt werden. An Hand der Zellvitalität, der Gesamtzellzahl und der Angaben über Perfusionszeiten sowie der Perfusionsrate wird die Brauchbarkeit der Methode beurteilt.
Die in der Literatur berichteten zahlenmäßig guten Ergebnisse der Leberzellisolation (26, 53, 68, 78, 79) konnten bei den Perfusionen HU-infundierter und hepatektomierter Tiere zunächst nicht erreicht werden, auch wenn die Methode nach verschiedenen Richtungen modifiziert wurde.

3.1.1. Vorperfusion (Tab. 1)

Mitentscheidend für den Erfolg der Zellisolation ist die technisch gute Durchführung der Vorperfusion, was sich nicht ohne weiteres in Zahlen ausdrücken läßt. Die etwas willkürlich erscheinende Festsetzung der Vorperfusionsmenge auf 170 ml Ca^{++}-Mg^{++}-freie Hanks-Lösung kommt dadurch zustande, daß diese Menge ausreicht, die Leber möglichst gleichmäßig

und vollständig zu entbluten. Die Vorperfusion wird bei allen Versuchen mit der gleichen Menge an Ca^{++}-Mg^{++}-freier Hanks-Lösung ausgeführt (170 ml Ca^{++}-Mg^{++}-freie Hanks-Lösung, pH 7,35, Temp. 37°C). Dabei wird am Anfang der Vorperfusion eine langsamere Perfusionsrate gewählt, da bei zu schnellem Flüssigkeitsstrom von Anfang an das völlige Entbluten von den Rändern des Organs her erschwert ist. Diese anfängliche Perfusionsrate kann sehr fein durch die Geschwindigkeit der Tropfenfolge im Infusionssystem eingestellt werden.
Die Eröffnung des Brustkorbes führt bei dem tief narkotisierten Tier zu einer deutlichen Verschlechterung der Kreislaufverhältnisse, was sich in einer lividen Verfärbung und Anschwellung der Leber als Ausdruck einer venösen Stauung zeigt.
Schwierig aber für den Erfolg der Perfusion ist es, diese Verfärbung und Anschwellung des Organs zeitlich möglichst zu begrenzen, was bedeutet, daß die Eröffnung des Thorax sowie das Legen und Fixieren der Perfusionsleitung mit anschließender Eröffnung des rechten Herzvorhofes in kürzester Zeit durchgeführt werden muß. Dies erfordert exakte Versuchsvorbereitung und lange Übung der einzelnen Handgriffe, kann dann aber schließlich von einer Person gut durchgeführt werden.

3.1.2. Enzymperfusion

Die Konzentration der Collagenase von 0,05% wird von verschiedenen Autoren übernommen (53, 68, 75). Sie scheint die geringsten Schädigungen an den Zellen hervorzurufen. Weitere Enzymkombinationen werden bei den hier durchgeführten Versuchen nicht verwandt.
Die Menge von 100 ml Perfusionslösung scheint unter den gegebenen Umständen günstig. Dabei reicht eine einfache Perfusion mit kleiner Perfusionsrate ohne Rezirkulation der Enzymlösung für befriedigende Ergebnisse nicht aus. Bei an-

nähernd einheitlicher technischer Ausführung, bei konstanten Bedingungen für die Vorperfusion ist die Vitalität der durch einfache Enzymperfusion isolierten Zellen deutlich geringer. Für die Isolation der Zellen ist hierbei auch nach der Perfusion erheblich mehr technischer Aufwand erforderlich, um die für den Versuch benötigte Zellmenge zu erhalten. Und dennoch ist neben der Vitalität auch die Zahl der isolierten Zellen geringer. In welchem Zusammenhang die Höhe des Trypan-Blau-negativ-Index mit der Dauer und der Art der Manipulation nach der Perfusion steht, kann hier im einzelnen nicht untersucht werden. Es scheint jedoch naheliegend, daß eine zunehmende Manipulation die ohnehin schon vorgeschädigten Zellen noch weiter angreift (Tab. 1a).

Die weitere Verbesserung des Systems führt dazu, die Leber mit größeren Enzymmengen zu durchströmen. Dies wird mit Hilfe der eingangs beschriebenen Rezirkulationsmethode bei allen weiteren Versuchen erreicht. Trotz der Auskühlung des entbluteten Tieres konnte die Temperatur der Rezirkulationslösung mittels der beschriebenen Wasserbäder auf Werte um 36°C gehalten werden. Das pH der Perfusionslösung fällt bis zum Ende der Perfusion von 7,35 auf 7,25 ab.

Durch Anwendung dieser einfachen Rezirkulation kann die Perfusionsdauer bei gleichem Gesamtvolumen der Enzymlösung verlängert werden. Der Versuch, mit höheren Perfusionsraten die Dauer der Leberperfusion zu verkürzen, bringt jedoch hinsichtlich der Vitalität nicht den gewünschten Erfolg. Wenn auch mit höherer Perfusionsrate die Zahl der isolierten Zellen erhöht werden kann, so bleibt doch die Vitalität der Hepatozyten im Vergleich zur ersten Versuchsgruppe gleich niedrig, sie ist sogar etwas geringer (Tab. 1b).

Die erzielte höhere Zellzahl könnte ohne weiteres mit der verlängerten Wirkungszeit der Collagenase an ihrem Wirkungsort zusammenhängen, bei höherer Durchflußmenge der Collagenase pro Zeiteinheit. Der immer noch niedrige Trypan-Blau-negativ-Index, der eventuell auch von einer unmittelbaren

Wirkung der Collagenase auf die Zellintegrität herrühren könnte, leitet über zu den Versuchen mit schonenderer Enzymperfusion, was eine kleinere Perfusionsrate bedeutet.

Den hierbei auftretenden längeren Enzymperfusionszeiten sind zwei Beschränkungen entgegengesetzt:
Zum Ersten soll die Zeitdauer der Zellisolation insgesamt nicht übermäßig lange dauern, um möglichst schon frühzeitig einsetzende Veränderungen der Zellen in der DNA-Synthese zu erfassen und die Zellen schnell in die Kultur zu bringen.

Zum Zweiten ist bei Perfusionen mit einer Dauer von 30 min und darüber eine Auflösung von Bindegewebsstrukturen, wie Leberkapsel und Stromagewebe, zu beobachten, so daß eine effektive Perfusion des gesamten Organs nicht mehr sicher und die präparative Entfernung der Leber als Ganzes sehr erschwert oder sogar unmöglich ist.

Die hier dargestellten Werte für Perfusionsrate und -dauer (Tab. 1c) gelten für alle weiteren Versuche, die für die eigentliche Fragestellung ausgewertet wurden.

Für eine deutliche Verbesserung der Ergebnisse sind also neben der genauen Versuchsplanung und der einwandfreien Beherrschung der Versuchstechnik die längere Wirkung der Collagenase auf das Bindegewebe, das größere Perfusionsgesamtvolumen und die langsamere Perfusionsrate entscheidend.

Tabelle 1: Ergebnisse der Leberperfusion eines 2/3-hepatektomierten Tieres (200 gr KG) nach 25-stündiger HU-Infusion.

	Präperfusion Rate (ml/min)	Perfusion Dauer (min)	Perfusion Rate (ml/min)	Perfusion Gesamtvolumen (ml)	Vitalität (Trypanblau negativ %)	Zellzahl (Gesamt)
1.a	28,1	14	7,1	100	30	$25,7 \times 10^6$
	±6,8		±1,2		±6	±0,5
1.b	26,1	15,2	13,2	200	24,3	$58,0 \times 10^6$
	±5,2	±0,9	±2,0	±16	±7,2	±12,5
1.c	23,0	25,5	7,4	190	50,0	$87,7 \times 10^6$
	±5,2	±1,6	±0,7	±14,1	±5,9	±18,5

Angaben als Mittelwerte mit Standardabweichung (±)

1.a Konstante Vorperfusion mit 170 ml Ca^{++}-Mg^{++}-freier Hanks-Lösung, Enzymperfusion mit 100 ml 0,05%iger Collagenase-Lösung, ohne Rezirkulation (n = 5).

1.b Konstante Vorperfusion (s.o.)
Enzymperfusion der Collagenase-Lösung mit Rezirkulation bei schneller Perfusionsrate (n = 5).

1.c "Optimierte Perfusionsmethode": konstante Vorperfusion.
Enzymperfusion mit Rezirkulation bei langsamer Perfusionsrate (n = 12).

Durchführung aller weiteren Versuche nach der "optimierten Perfusionsmethode".

3.1.3. Versuchsgruppen

Eine weitere Verbesserung der Zellvitalität isolierter Zellen sowie der Gesamtzellzahl kann bei den Tieren, die hepatektomiert und zusätzlich 25 Stunden mit HU infundiert waren, nicht erreicht werden. Um Ergebnisse von verschiedenen Gruppen vergleichen zu können, wird in den folgenden verschiedenen Versuchsgruppen immer die gleiche Isolierungsmethode angewandt. Mit der oben beschriebenen optimierten Perfusionsmethode ergeben sich bei den folgenden Versuchsgruppen verschiedene Ergebnisse hinsichtlich Vitalität und Zellzahl.

Gruppe A: Leberperfusion von Ratten ohne vorangegangene Hepatektomie und HU-Infusion.
Um technisch gleiche Versuchsbedingungen für alle Perfusionen herzustellen, und da an sich die Leberperfusion eines nicht 2/3-resezierten Organs andere Versuchsbedingungen erfordern würde, wird bei dieser Gruppe von Tieren eine 2/3-Resektion der Leber und unmittelbar anschließend die Leberperfusion mit Collagenase durchgeführt. Auf diese Weise können die Menge der Perfusionslösungen sowie die Dauer des Perfusionseingriffes für alle Versuche annähernd gleich gehalten werden.

Die Ergebnisse dieser Gruppe sind, zumindest was die Vitalität der Zellen betrifft, bei keiner anderen Versuchsgruppe erreicht worden. Die Zahl der Zellen, die ohne mechanische Manipulation isoliert werden kann, liegt im oberen Bereich der sonst erreichten Werte (Tab. 2a).

Gruppe B: Enzymperfusionen von Tieren in verschiedenen Abständen nach 2/3-Hepatektomie, jedoch ohne HU-Infusion.

Die Ergebnisse dieser Gruppe sind nicht so einheitlich zu beurteilen. Die Zellisolation wird 3, 12, 14, 24, 48 und 72 Stunden nach Teil-Hepatektomie vorgenommen. Die Zahl der isolierten Zellen liegt im Bereich der Gruppe A. Die Zahl

der Trypan-Blau-negativen Zellen liegt bei 3 Versuchen (3, 48, 72 Std. zwischen HU-Ende und Beginn der Organperfusion) nahe bei den Zahlen, die bei unbehandelten Tieren erreicht wurden. Bei den übrigen Versuchen dieser Gruppe liegen jedoch die Vitalitätszahlen niedriger, wenn auch mit ansteigender Tendenz, je größer der zeitliche Abstand zur Hepatektomie ist. Hervorzuheben ist auch hier, daß in dieser Versuchsgruppe die technische Durchführung der Perfusion in den angeführten Versuchen nahezu gleichmäßig sehr gut gelang, der Anstieg in den Vitalitätszahlen also nicht auf eine Veränderung der Technik zurückzuführen ist (Tab. 2b).

Gruppe C: Leberzellisolation nach Beendigung einer 25-stündigen HU-Infusion mit vorangegangener 2/3-Hepatektomie.

In dieser Gruppe wurden die Versuchstiere einer 2/3-Hepatektomie mit anschließender HU-Infusion unterzogen. Die Zahl der isolierten Zellen liegt in der gleichen Höhe wie die der übrigen Gruppen. Hingegen ist die Zahl der vitalen Zellen deutlich reduziert gegenüber den Versuchen ohne HU. Wie die relativ niedrige Standardabweichung zeigt, streuen die einzelnen Werte nur gering um den Mittelwert von 50% intakter Zellen, somit ist eine vergleichbare Tendenz wie bei Gruppe B in dieser Versuchsgruppe nicht zu beobachten (Tab. 2c).

Tabelle 2: Unterschiede bezüglich Zellvitalität und Zellzahl nach Leberperfusion von unterschiedlich vorbehandelten Ratten.
Alle Perfusionsmethoden wurden nach der "optimierten Perfusionsmethode" durchgeführt (s. Tab. 1c).

	Zellvitalität (Trypanblau) %		Gesamtzellzahl
2.a	87,7 ±2,3		98,0 x 10^6 ±8,3
2.b	81,0	3 Std. nach 2/3-Hepatektomie	
	53,2	12 "	
	68,0	14 "	95,0 x 10^6 ±12,5
	74,8	24 "	
	81,0	48 "	
	85,6	72	
2.c	50,8 ±5,9		87,7 x 10^6 ±18,5

Alle Angaben von 2.a und 2.c als Mittelwert mit Standardabweichung (±).

2.a Gruppe A: Leberzellisolation von unbehandelten Tieren (200 gr), (n = 2).

2.b Gruppe B: Leberzellisolation in zunehmendem Abstand nach 2/3-Hepatektomie, keine HU-Dauerbehandlung.

2.c Gruppe C: Leberzellisolation nach 2/3-Hepatektomie und 25-stündiger HU-Infusion (n = 12).

.1.4. Zellausstriche

Zellausstriche der frischen Zellsuspension wurden zur Kontrolle der isolierten Zellen angefertigt. Die Zellsuspension enthielt fast ausschließlich gleichgroße Zellen. In gut dargestellten Zellkernen waren meist mehrere Nucleoli zu erkennen.

Vom lichtmikroskopischen Aspekt konnten im Ausstrich der Hepatozyten Zellen verschiedener Anfärbbarkeit und auch Morphologie unterschieden werden. Etwa die Hälfte der Hepatozyten waren in der HE-Färbung deutlich und kräftig mit stark basophilen Zellkernen und intensiv eosinophilem Zellplasma angefärbt. Darüber hinaus bestanden bei diesen Zellen zwei verschiedene Zellkernformen. Gerade bei Tieren, die weder hepatektomiert noch HU-infundiert waren, überwogen bei den stark angefärbten Zellen große, locker strukturierte Kerne mit gut sichtbaren, oft mehreren Nucleoli. Diese Kerne sehen den Zellkernen im normalen Leberschnittpräparat sehr ähnlich und wurden daher als normale Hepatozyten bezeichnet. Daneben waren auch kleine, ganz dicht basophil gefärbte Zellkerne in den Ausstrichen, die an pyknotische Zellkerne erinnern. In diesen Zellkernen konnten Nucleoli nicht differenziert werden. Die Zahl dieser dunklen Zellen mit den pyknotischen Zellkernen nahm in den Versuchen mit Hepatektomie und HU-Infusion zu. In allen Versuchen waren jedoch immer beide Zellbilder vorhanden.

Bei allen Versuchen waren unabhängig von der Vorbehandlung der Tiere in den ersten Ausstrichen auch blasse, große Zellen vorhanden. Die Kerne dieser Zellen erschienen weniger gut strukturiert. Nucleoli waren nur vereinzelt und selten sichtbar. Die Zell- sowie die Kernbegrenzung schien weniger deutlich als in den stark angefärbten Zellen. Insgesamt machten diese Zellen einen hydropisch aufgequollenen Eindruck. Dabei waren sowohl Übergänge zu den dunkel gefärbten Zellen einerseits, sowie auch Zellen in den verschiedenen Phasen bis zur völligen Auflösung sichtbar.

Zunächst wurden die Zellen, die lichtmikroskopisch eine Morphologie wie die Leberparenchymzellen in Organschnitten zeigten, als biologisch intakte Zellen angesehen. Unterstützt wird diese Ansicht durch die Tatsache, daß in den entsprechenden Versuchen, in deren Ausstrichen Mitosephasen sichtbar sind, diese nur in den dunkel gefärbten Zellen auftreten (s. auch Georg Manolikakis: "In vitro Untersuchungen zur Mitoseaktivität Isolierter Hepatozyten an Rattenleber nach Teilhepatektomie und Hydroxyharnstoff-Dauerbehandlung." Inaugural-Dissertation 1980). Zusätzlich zeigt sich, daß die Zahl der dunkel gefärbten Zellen in den einzelnen Ausstrichen der inkubierten Zellsuspensionen mit zunehmender Inkubationsdauer deutlich abnimmt. Zwei Befunde lassen diese Annahme aber schon wieder zweifelhaft erscheinen: Eine entsprechende Beziehung zwischen der Zahl der Trypan-Blau-negativ-Zellen und der Zahl der stark gefärbten Hepatozyten besteht nicht, in den Autoradiographien sind fast ausschließlich die blass gefärbten Zellen mit gut erhaltener Struktur radioaktiv markiert.

In keinem der angefertigten Ausstriche konnten Zellen mit mehr als 2 Kernen gesehen werden. Der Anteil der 2-kernigen Zellen zur Gesamtzahl kann, entsprechend den einzelnen Versuchsgruppen aufgeteilt, folgendermaßen ermittelt werden:

In unbehandelten Organen werden 33,8% bzw. 32,9% 2-kernige Zellen gefunden (Tab. 3a). In der nur hepatektomierten Leber (Tab. 3b) sind die Ergebnisse abhängig vom Zeitpunkt der Zellisolation nach Hepatektomie: Während in den ersten Stunden nach Hepatektomie der Anteil der 2-kernigen Zellen noch dem der unbehandelten Leber entspricht, sinkt der Wert doch bis zur 72. Stunde nach Hepatektomie deutlich ab. In diese abfallende Kurve läßt sich der Wert der Leberausstriche von hepatektomierten und infundierten Tieren gut einfügen: Mit einer Standardabweichung von $\pm$ 3,9 beträgt die Zahl der 2-kernigen Zellen 28,7% (Tab. 3c).

Vereinzelt waren in den Zellsuspensionen Zellen sichtbar, die sich sowohl in Größe und Form der Gesamtzellen als auch in der Kerngröße und Korndichte von dem Großteil der Zellen der Suspensionen unterschieden.
Teilweise konnten diese Zellen aufgrund ihrer Kernform in der HE-Färbung als Lympho- und Leukozyten differenziert werden. Daneben müssen aber auch Bindegewebszellen, Kupffer-Sternzellen und Gallenepithelzellen als Bestandteile der Suspension angenommen werden.

Tabelle 3: Anteil der zweikernigen Zellen in der Zellsuspension isolierter Leberzellen nach unterschiedlicher Vorbehandlung der Tiere.
Für jeden Versuch wurden 2000 Zellen im Zellausstrich ausgezählt.

3.a	33,8%	200 gr KG	
	32,9%	300 gr KG	
3.b	33,3%	200 gr KG	3 Std. nach Hepatektomie
	22,1%		12
	26,6%		14
	30,8%		24
	13,5%		48
	11,5%		72
3.c	28,7%	200 gr KG	
	(± 3,9)	Mittelwert und Standardabweichung von 12 Versuchen	

3.a Gruppe A: Leberzellen von unbehandelten Tieren

3.b Gruppe B: Leberzellen in zunehmenden Abständen nach 2/3-Hepatektomie isoliert, keine HU-Dauerbehandlung.

3.c Gruppe C: Leberzellen nach 2/3-Hepatektomie und 25-stündiger HU-Infusion isoliert (n = 12).

3.2. Autoradiographien und Scintillationsmessung

In diesem Abschnitt sollen Autoradiographien und Scintillationsmessung im Zusammenhang besprochen werden. Es sind für die einzelnen Zeitabschnitte mehrere Versuche zusammengefaßt, da es nicht möglich war, für jeden Versuch von vornherein die Präparationsdauer exakt festzulegen. So sind die folgenden Zeitpunkte mit der jeweiligen Abweichung der einzelnen Versuchszeiten vom Mittelwert festgelegt (Tab. 4).

Die Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchen in der Höhe der "Counts per minute" (cpm) sind teilweise sehr groß. Da sonst gleiche Bedingungen für alle Versuche eingehalten werden, diese sich aber hinsichtlich der inkubierten Zellzahl pro Inkubationsgläschen unterscheiden, werden die cpm der einzelnen Meßpunkte durch die jeweilige Zellzahl pro ml Zellsuspension dividiert. Der somit erhaltene Wert ergibt cpm/Einzelzelle.
Auf diese Weise ist es möglich, die einzelnen Versuche besser zu vergleichen. Die Streuung bei einzelnen Werten dürfte auf die statistische Streuung bei der Verteilung der Zellsuspension auf die Inkubationsgläschen zurückzuführen sein.

Tabelle 4:

Durchschnittliches Intervall zwischen HU-Infusionsdauer und Beginn der 30-minütigen Inkubation der ersten Meßprobe mit 3H-TdR.

Anzahl der Versuche	Intervall zwischen HU-Infusion u. Beginn der Inkubation	Inkubationsdauer (Std.)
5	2 Std. 0 min ± 6 min	9
4	3 " 0 " ± 15 "	6
3	4 " 30 " ± 3,5 "	6
1	5 " 30 "	8
3	7 " 25 " ±10,6 "	6

Eine exakte Zeitplanung für die Durchführung der Leberperfusion war bei den einzelnen Versuchen nicht möglich. Daher werden mehrere Versuche jeweils zu einem Zeitpunkt zusammengefaßt. Für die Interpretation ist dabei das Intervall zwischen HU-Infusionsende und Beginn der Zellinkubation der Meßproben, für die graphische Darstellung die Zeitspanne zwischen HU-Infusionsende (Punkt 0 der Abszisse) und dem Ende der Inkubation der ersten Meßprobe mit 3H-TdR (1. Meßpunkt der Kurven von Scintillationsmessung und Autoradiographien) entscheidend.

3.2.1. Kontrollversuche

Als Kontrollversuche wurden folgende Versuche durchgeführt: Die Leberzellen wurden unmittelbar nach 2/3-Hepatektomie (s. Versuchsgruppe 2a, Tab. 2) bzw. 14 Stunden nach Hepatektomie isoliert. Eine HU-Behandlung fand nicht statt.

Diese Versuche dienen als Grundlage für die Beurteilung, ob die bei den Hauptversuchen ermittelten Ergebnisse signifikant unterschiedlich sind.

Bei den Autoradiographien lag der Anteil der markierten Leberzellen während der 6-stündigen Inkubation zwischen 0% und 0,5%.

In der Scintillationszählung zeigt die Kurve über 9 Stunden einen fast horizontalen Verlauf, das heißt, es findet zu allen Stunden ein gleichmäßiger Einbau des radioaktiven Thymidins

in den Zellen statt. Die Höhe der einzelnen Meßrate liegt dabei signifikant unter denen der eigentlichen Hauptversuche (Abb. 1).

3.2.2. Autoradiographie und Scintillationsmessung an Leberzellen nach 2/3-Hepatektomie und 25-stündiger HU-Infusion.

Einen Vergleichsmaßstab für die biologische Wertigkeit der hier vorgelegten Ergebnisse liefern in erster Linie die von RABES und Mitarbeitern erzielten Ergebnisse an regenerierender Rattenleber nach 2/3-Hepatektomie und anschließender kontinuierlicher HU-Infusion über 25 Stunden (93, 95).

Während bei jenen Versuchen von RABES et al. jeder Meßpunkt der Kurve die Ergebnisse eines oder mehrerer Tiere darstellt, stammen die Meßpunkte der hier vorgelegten einzelnen Kurven jeweils von einem Tier. Tabelle 5 zeigt, daß in dem verwendeten System ein Qualitätsverlust der Kulturbedingungen mit steigender Inkubationsdauer eintritt, was sich sowohl im pH-Abfall als auch in der Abnahme des Vitalitätsindex während der Inkubation ausdrückt.

Tabelle 5: pH-Wert der Zellsuspension und Trypanblau-negativ-Index während 6-stündiger Zellinkubation von Leberzellen nach 2/3-Hepatektomie und HU-Infusion.
n = 3, Angaben als Mittelwert mit Standardabweichung

Dauer d. Inkubation (Stunden)	pH-Wert		Zellvitalität (%)	
0	7,4	+/-	65,0	+/- 5,9
1	7,35	0,1	41,0	6,2
2	7,31	0,12	35	4,4
3	7,24	0,08	12,3	1,8
4	7,2	0,1	9,1	2,0
5	7,1	0,1	7,1	1,3
6	7,0	0,1	5,3	1,3

2.1. Scintillationsmessung

Die Ergebnisse der Scintillationsmessung zeigen, daß die Leberzellen auch in vitro DNA synthetisieren. Dafür sprechen die im Vergleich zu den Kontrollversuchen mit unbehandelten Ratten deutlich höheren Inkorporationswerte der Scintillationsmessung. In der Zusammenfassung aller Versuche mit Leberzellen, die unmittelbar nach Beendigung der HU-Infusion isoliert wurden, zeigt die Scintillationsmessung einen Anstieg der Werte bis zur 4. Stunde der Gesamtinkubation, d.h. die größte DNA-Syntheserate liegt ungefähr in der 4. Stunde nach Beendigung des HU-Blocks (ABB. 1). Diese für die Versuchsbedingungen maximale DNA-Syntheserate findet auch noch zu einem Zeitpunkt statt, an dem bereits der Vitalitätsindex der einzelnen Versuchsproben deutlich abgesunken ist (Tab. 5). Entsprechend sollte der Abfall der Werte im Verlauf der Inkubation durchaus nicht nur von einer zunehmenden Verschlechterung der Versuchsbedingungen herrühren.

Zur Klärung der Frage, inwieweit ein inadaequates System an der Abnahme der Inkorporationsrate beteiligt ist, werden die Zeiträume zwischen Beendigung der HU-Infusion und dem Beginn der Leberperfusion verlängert.
Weder bei der Autoradiographie noch bei der Scintillationsmessung kommt es zur einfachen Verschiebung der oben dargestellten Kurve entlang der Zeitachse nach rechts, was den Kurvenverlauf als systembedingt ausgewiesen hätte. Schon bei den Versuchen, bei denen der erste Meßpunkt in der 3. Stunde nach HU-Block-Ende liegt, zeigt sich in der Scintillationsmessung (Abb. 2) eine Abnahme der Inkorporationsrate.
Bei allen folgenden Versuchen mit zunehmendem Abstand zwischen HU-Block-Ende und Zellisolation kann weder die anfängliche Höhe der Inkorporation von 3H-Tdr in die DNA erreicht, noch ein Anstieg der Inkorporationsrate bis zur 3. Versuchsstunde beobachtet werden. Es zeigt sich vielmehr eine stetige Abnahme der Inkorporation über die gesamte Versuchsdauer (Abb. 2 - 5). Dabei reicht der gesamte Beobachtungszeitraum

von der 3. bis zur 12,5. Stunde nach Beendigung der HU-Dauerinfusion.

3.2.2.2. Autoradiographie

Ähnliche Ergebnisse können bei den Autoradiographien erzielt werden (Abb. 6 - 9). Die maximale Inkorporation von 3H-Tdr im Zellkern liegt in der 4. Stunde nach HU-Block-Ende. Dies gilt für die Versuche mit Zellisolation unmittelbar nach HU-Block-Ende bzw. mit kurzem Intervall zwischen HU-Block-Ende und Beginn der Zellisolation (Abb. 6 u. 7). Die maximale Rate der markierten Zellen liegt bei beiden Versuchsgruppen zwischen 14% - 20%. In den weiteren Versuchen mit zunehmendem Abstand zwischen HU-Block-Ende und Zellinkubation kommt es nur noch zum Kurvenabfall ohne erneute Peakbildung. Die Kurve der Abb. 8 kann ihrem Verlauf nach als Fortsetzung der Kurve in Abb. 7 angesehen werden. Von ihrer Lage her passen beide Kurven sehr gut zueinander.

In keiner Versuchsgruppe liegt bei unterschiedlicher Zeitdauer zwischen HU-Infusionsende und Beginn der Zellinkubation die Rate der markierten Zellen über 14%. Allein bei den Versuchen der Abb. 7 (Inkubationsbeginn 2,5 Stunden nach HU-Infusionsende) kommt es noch zu einem Anstieg dieses Wertes bis auf 20%. Die Zahl der markierten Zellen in vitro liegt somit signifikant unter den in vivo Ergebnissen (95), eindeutig jedoch über denen der hier durchgeführten Kontrollversuche.

In den Versuchen, deren Inkubation 2 Stunden nach HU-Block-Ende beginnt, liegt die Rate der dicht markierten Zellen konstant hoch mit Werten zwischen 50 und 80% aller markierten Zellen. Dabei ist auch während des Versuches keine eindeutige Abnahme dieser Rate zu sehen (Abb. 6). Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß im Vergleich zu den in vivo Ergebnissen die Gesamtzahl der markierten Zellen sehr gering ist, scheint doch ein Großteil der Zellen, die unter den gegebenen Versuchsbedingungen überhaupt in die DNA-Synthese eintreten,

diese synchron und mit der gleichen Syntheseaktivität zu durchlaufen.
Wie die Auswertung der weiteren Versuche aber zeigt, ist die Höhe der Syntheseaktivität der Zellen abhängig vom Zeitpunkt der Zellisolation. Bereits bei den Versuchen, deren Inkubationsbeginn 3 Stunden nach HU-Block-Ende liegt, nimmt die Zahl dicht markierter Zellen bis auf 0 ab (Abb. 7). Noch der erste Wert dieser Versuchsgruppe liegt in etwa in dem Bereich, in dem auch die Durchschnittswerte der Abb. 6 liegen. Der folgende steile Abfall der Werte könnte durch die biologische Unzulänglichkeit des Inkubationssystems oder durch eine Schädigung der Zellen schon bei der Zellisolation bedingt sein.
Bemerkenswert bleibt dennoch der steile und parallel verlaufende Abfall beider Kurven in Abb. 7, wobei die Abnahme des Markierungsindex als Ausdruck eines biologischen Geschehens zu deuten wäre.

Zusammenfassung der Ergebnisse von Autoradiographie und Scintillationsmessung:
Im Vergleich zu den Kontrollversuchen ist nach Beendigung des 25-stündigen HU-Blockes ein eindeutiger Anstieg der DNA-Synthese in der Autoradiographie und der Scintillationszählung zu verzeichnen, mit den höchsten Werten zwischen der 3. und der 4. Stunde nach HU-Block-Ende.
Die Abnahme der DNA-Synthese in vitro nach der 4. Stunde nach HU-Block-Ende gleicht einerseits den in vivo Ergebnissen der Autoradiographie mit dem gleichen Untersuchungsmaterial. Andererseits muß die Verschlechterung der Kulturbedingungen in vitro für die Abnahme der DNA-Syntheserate mit zunehmender Inkubationsdauer berücksichtigt werden.

Bei den Zellen, die unmittelbar nach HU-Block-Ende isoliert wurden, ist die DNA-Syntheseaktivität über 7 Stunden relativ hoch mit Werten zwischen 50 und 80%; bei in vitro synthetisierenden Zellen, die erst verspätet isoliert wurden, nimmt die DNA-Syntheseaktivität mit steigender Inkubationsdauer deutlich ab.

3.3. Ergebnisse der Impulscytophotometrie

3.3.1. Technische Eichkurve

Um interpretierbare Ergebnisse zu erzielen, muß das Impulscytophotometer zunächst geeicht werden. Als Meßprobe für die technische Geräteeichung werden die von der Geräteherstellerfirma gelieferten Hühnererythrozyten verwandt. Diese stellen, in einer geeigneten Fixierlösung aufbewahrt, eine Suspension von Zellen mit konstantem und gleichem DNA-Gehalt in jeder Zelle dar. Diese Zellen werden in gleicher Weise wie die Leberzellen mit Ethidiumbromid (Ebr) gefärbt. Das Gerät ist technisch optimal geeicht, wenn das bei der Messung erzielte DNA-Histogramm folgende Vorraussetzungen erfüllt (Abb. 10):

Der dargestellte Peak als Ausdruck einer einzigen DNA-Klasse muß schmal (kleine Standardabweichung), die dazu benötigte Gesamtzahl der Meßimpulse (Counts total) gering und der Inhalt der einzelnen Meßkanäle beidseits des Mittelwertes weitgehend gleich groß, d. h. symmetrisch sein.

Mit der Erfüllung dieser Bedingungen ist das optische System des ICP, bestehend aus Lichtquelle, Köhlerscher Optik sowie Meßkammer richtig eingestellt.

Der in der Abbildung mit dargestellte Peak rechts vom Hauptpeak stellt insgesamt nur einen ganz kleinen Anteil des Gesamt-DNA-Histogramms dar (3,6%) und läßt sich als Verklumpung mehrer Hühnererythrozyten bzw. als Verklumpung von Zelldetritus interpretieren.

3.3.2. Biologische Eichung

Die biologische Eichung legt fest, in welchem der 128 Kanäle (entsprechend den Einheiten auf der Abszisse) die Zellen mit dem DNA-Gehalt entsprechend einem diploiden Chromosomensatz (2c) liegen sollen. Grundlage dafür sind die Thymuszellen 20 bis 21 Tage alter Ratten, deren Isolation durch Zerkleinerung des Organs nach Entfernung aus dem Äther-narkotisierten Tieren und anschließende Filtration durch eine 4-schichtige

Baumwollgaze gelingt. In Methanol fixiert können diese Zellen über Wochen bei +4°C aufbewahrt werden. Für die Messung werden sie der gleichen Präparation und Vorbereitung wie die Hepatozyten unterzogen. Durch Veränderung der HV (High Voltage) wird das Peakmittel des DNA-Histogramms dieser Zellen auf den Kanal 25 der Abszisse gelegt (Abb. 11). Wenn die Optik des Gerätes richtig eingestellt ist, muß auch bei dieser Eichung gelten, daß die Standardabweichung möglichst klein und der Aufbau der Kurve symmetrisch ist. Auf Grund zahlreicher Eichungen, die immer wieder das gleiche Verhältnis der Peakmittel beider Eichkurven (biologisch: technisch wie 25 : 11) zeigt, kann mit zunehmender Erfahrung auf die aufwendige und technisch schwierige biologische Eichung mit Rattenthymozyten ganz verzichtet werden. Wie schon erwähnt, wird die Eichung mit Hühnererythrozyten während des ganzen Meßvorganges häufig durchgeführt.

3.3. Grundlagen der Histogrammauswertung

Anhand eines Standard-Histogramms soll die Auswertung sowie die grundsätzliche Interpretation der Histogramme erläutert werden (Abb. 12). Die Werte der Abszisse entsprechen dem relativen DNA-Gehalt der Zellen bzw. der Fluoreszenzintensität, die Einheit der Ordinate gibt die Zellzahl der einzelnen DNA-Stufen an. Eine Einheit der Abszisse entspricht einem Kanal des Vielkanalanalysators (128 Kanäle). Das Peakmittel der Zellen mit diploidem Chromosomensatz liegt in Kanal 25, das der Zellen mit tetraploidem Chromosomensatz in Kanal 50 und schließlich angedeutet das Peakmittel der oktoploiden Zellen in Kanal 100 (wie 1:2:4). Entsprechend verhält sich auch die mittlere Halbwertsbreite der einzelnen Peaks und damit auch ihre maximalen Halbwertsbreiten wie 1:2:4.

Die Abszisse ist nach folgendem System unterteilt:

Alle DNA-Klassen, die zwischen a2 und b1 bzw. b2 und c1 und rechts von c2 liegen, entsprechen Zellen, die in ihrem DNA-

Gehalt zwischen 2c und 4c, 4c und 8c und über 8c liegen und somit zumindest theoretisch S-Phasenzellen sind. Im vorliegenden Fall der adulten Rattenleberzellen liegt der Anteil dieser Zellen sowohl zwischen 2c und 4c wie auch zwischen 4c und 8c jeweils unter 3%. Berücksichtigt werden muß bei diesem kleinen Wert noch eine gewisse Verunreinigung durch Zelldetritus sowie durch die Zellpräparation (RNAse-Behandlung). Fehler sind daher nicht völlig zu vermeiden und beeinflussen diese zwischen den Peaks liegenden Werte. Zu interpretieren bleibt noch der Teil des Histogramms, der auf der Abszisse links vom 2c Peak liegt. Dieser Teil wird als Zelldetritus angesehen, da hypodiploide Zellen bei normalen somatischen Zellen nicht vorkommen.

In Anlehnung an die Methode von Andreef (96) werden die Histogramme folgendermaßen ausgewertet:
Die Abszisse wird in folgende Abschnitte eingeteilt, indenen einzelne Peaks ausgezählt werden (Abb. 12):

a: diploide Zellen Peakmittel μ=Kanal 25 (von a1 bis a2) = 11 Einh. a. d. Abszisse

b: tetraploide Zellen Peakmittel μ=Kanal 50 (von b1 bis b2) = 21 Einh. a. d. Abszisse

c: oktoploide Zellen Peakmittel μ=Kanal 100 (von c1 bis c2) = 41 Einh. a. d. Abszisse

d: links von a1 gelegen: Zelldetritus

e: zwischen 2c und 4c gelegen als Zone der Zellen in der DNA-Synthese mit früher (e1) und später (e2) S-Phase (a2 - b1).

f: mit f1 und f2 als Synthesephase zwischen 4c und 8c, jeweils mit früher (f1) und später (f2) S-Phase (b2 - c1).

3.3.4. Standard-Histogramm: Leberzellen eines vor der Collagenase-Perfusion unbehandelten Tieres (200 gr KG, männlich)

Die Auswertung dieses Histogramms kann durch einfache prozentuale Berechnung der einzelnen Flächeninhalte an der Gesamtfläche vorgenommen werden. Für das Kontrolltier sind die Werte in Abb. 12 angegeben.

Für die Auswertung der Histogramme nach Inkubation der isolierten Zellen wird zusätzlich zur oben angeführten Einteilung der Abszisse nach biologischen Gesichtspunkten eine zweite Zuordnung der Abszissenabschnitte festgelegt (Abb. 13):

Abszissenabschnitt	Teilabschnitt	Biolog. Zuordnung
I. 1 - 25 (0 - a)	1 - 19	Zelldetritus
	20 - 25 (a1-a)	1.Peakhälfte d. diploiden Zellen
II. 25 - 50 (a - b)	25 - 30 (a-a2)	2.Peakhälfte d. diploiden Zellen
	31 - 39 (a2-b1)	S-Phasebereich zwischen diploiden u. tetraploiden Zellen
	31 - 34	frühe S-Phase
	35 - 39	späte S-Phase
	40 - 50 (b1-b)	1.Peakhälfte d. tetraploiden Zellen
III. 51 - 100 (b-c)	51 - 60 (b-b2)	2.Peakhälfte d. tetraploiden Zellen
	61 - 71 (b2-c1)	S-Phasebereich zwischen tetraploiden u. oktoploiden Zellen
	61 - 69	frühe S-Phase
	70 - 79	späte S-Phase
	80 - 100 (c1-c)	1. Peakhälfte d. oktoploiden Zellen
IV. 101 - 128	101 - 120 (c-c2)	2. Peakhälfte d. oktoploiden Zellen
	121 - 128	S-Phasebereich über 8c hinaus

Die einzelnen Abschnitte werden unter Berücksichtigung ihrer Teilabschnitte ausgezählt. Anschließend wird das Standard-Histogramm des Kontrolltieres, das auf durchsichtige Folie übertragen wurde, genau über das auszuwertende Histogramm gelegt. Durch die Übertragung der Standardpeaks von 2, 4 und 8c auf die auszuwertenden Histogramme können bei diesen die Anteile dieser Abschnitte, die in dem Gesamtkurvenbild verborgen liegen, bestimmt werden. Folgende Abschnitte wer-

den durch die Überlagerung ausgezählt:

a1 - a : Kanal 20 - 25 (Einheiten auf der Abszisse)
a - a2: Kanal 25 - 30 " " " "
b1 - b : Kanal 40 - 50 " " " "
b - b2: Kanal 51 - 60 " " " "

Durch einfache Addition der zusammengehörigen Abschnitte (a1 - a und a - a2) lassen sich sowohl die Anteile der einzelnen Bereiche von euploiden Zellen ausrechnen, als auch durch Subtraktion der Abschnitte a1 - a usw. von den diese beinhaltenden Abschnitten I, II, III bzw. IV der Anteil der zwischen den euploiden Bereichen liegenden Abschnitten e und f und der Zelltrümmer (links vom 2c-Peak) ermitteln (Abb. 13). Die Aufteilung in die frühe bzw. späte S-Phase wird dort vorgenommen, wo nach den Standard-Histogrammen mit Sicherheit nicht mehr mit Zellen zu rechnen ist, die dem euploiden Zellpeak zugehören (Abb. 12).

Bei der Auswertung des 8c Peaks wird die Hälfte des Peaks, die niedriger als die andere erscheint, ausgezählt. Der so ermittelte Wert wird verdoppelt und stellt zusammen mit dem Kanalinhalt des Mittelwertes von 8c einen Annäherungswert des 8c Bereiches dar.
Für die Ermittlung der hier dargestellten Ergebnisse, deren Wertigkeit auch im Vergleich mit der Scintillationsmessung und der Autoradiographie in einem eigenen Abschnitt erörtert werden soll, gilt, unabhängig vom Bild einzelner Histogramme, folgende wichtige Voraussetzung: Wie oben schon gezeigt, müssen die Peakmittel für die di- tetra- und oktoploiden Zellen bei Kanalnummer 25, 50 und 100 auf der Abszisse liegen.

.3.5. Leberzellhistogramm unbehandelter Tiere (350 gr), (Abb. 14)

Im Vergleich zum Kontrolltier von 200 gr KG fällt die deutliche Verminderung der diploiden Zellen zugunsten der tetraploiden Zellen auf, bei ungefähr gleichbleibendem Anteil an oktoploiden Zellen. Auch nimmt der Anteil der Zellen im Zwischenbereich von 4c und 8c zu (4,7%), während Zelldetritus vor dem 2c Peak fehlt und der Anteil zwischen 2c und 4c 0,29% beträgt. Es ist wenig wahrscheinlich, daß im Vergleich zum Kontrolltier (Abb. 12) die unbehandelten Leberzellen eines 350 gr-Tieres, speziell die tetraploiden Zellen, vermehrt in die S-Phase eintreten.
Auch Verunreinigungen durch Zelldetritus oder Zellverklumpungen sind beim Histogramm der Abb. 14 weniger wahrscheinlich, da sich diese auch im Bereich von 2c und zwischen 2c und 4c darstellen müßten.

Daher dürfen die Mittelwerte für den Bereich e bzw. f, gebildet aus der Summe der Einzelwerte der entsprechenden Abschnitte beider Histogramme (Abb. 12 u. 14), als kleinste gerätespezifische Fehlerwerte für die Zwischenbereiche angenommen werden: für den Bereich zwischen 2c und 4c 0,56% (0,29 - 0,48), für den Bereich zwischen 4c und 8c 3,8% (2,99 - 4,7).

Unter der Vorraussetzung, daß in der nicht vorbehandelten Rattenleber eine nennenswerte DNA-Synthese nicht stattfindet, stellen die Histogramme der Abb. 12 und 14 optimierte Ergebnisse aus zahlreichen wiederholten Messungen der Zellsuspension unbehandelter Leberzellen bezüglich der Zwischenbereiche zwischen den einzelnen Hauptpeaks dar.

3.3.6. Histogramme von Leberzellen adulter Tiere (200 gr) in verschiedenen Abständen nach Hepatektomie

3 Stunden nach Hepatektomie ist die Zahl der di- und tetraploiden Zellen unmittelbar nach der Isolation in Größenordnungen wie bei Leberzellen nicht behandelter Tiere (Abb. 15). Es kommt aber bereits zu einer eindeutigen Zu-

nahme von Werten zwischen 2c und 4c (10,7%), kaum jedoch zwischen 4c und 8c (3,3%), (Abb. 16). Die Unterteilung des Zwischenbereiches (e1/e2) zeigt, daß schon mehr als die Hälfte der Zellen mit aneuploidem DNA-Gehalt mit der Synthese weit fortgeschritten sind. Der Anteil der oktoploiden Zellen ist dabei um 3% zurückgegangen, jedoch kann eine Verschiebung der Zellen 8c nach rechts, also in Richtung auf noch höhere Ploidiestufen nicht gefunden werden (Abb. 15).

Mit zunehmenden Abständen der Zellisolation von der Hepatektomie setzt sich insgesamt etwa folgender Trend in den Histogrammen durch (Abb. 15 und 16):
Abnahme der 2c Zellen bis unter Werte wie sie bei dem 350 gr Tier erreicht werden (bis 18%). Abnahme der 4c Zellen bis unter 40% in der 24. Stunde nach Hepatektomie mit erneutem Anstieg auf 47% in der 72. Stunde. Nahezu Verdopplung der oktoploiden Zellen bis 48 Stunden nach Hepatektomie (10%). Die Zunahme der Zellen mit aneuploidem DNA-Gehalt setzt sich fort, ein erster Gipfel mit 32% ist schon bei Zellen 12 Stunden nach Hepatektomie erreicht. Nach einer Abnahme bis auf 20% in der 14. Stunde bleiben dann ca. 25% aller Zellen in der 24., 48. und 72. Stunde im sogenannten S-Phasen-Bereich.

Bei der Einteilung der S-Phase in die einzelnen Bereiche zwischen 2c und 4c bzw. 4c und 8c zeigen die Zellen zwischen 2c und 4c einen gleichmäßigen Kurvenverlauf, langsam ansteigend auf ca. 15%, 24 Stunden nach Hepatektomie, bis zur 72. Stunde dann abfallend unter 10%. Die Zellen zwischen 4c und 8c zeigen 2 maximale Werte, einen in der 12. (19%), den anderen in der 72. Stunde nach Hepatektomie (18%), (Abb. 16).

Insgesamt ist der frühe und steile Anstieg der Zellen im sogenannten S-Phasen-Bereich überraschend. Da ein solcher Anstieg nicht zu erwarten ist, müssen neben auswertungstechnischen Schwierigkeiten auch bindungsspezifische Besonderheiten zwischen DNA und Ethidiumbromid vermutet werden.

3.7. Stündliche Histogramme von Leberzellen während 7-stündiger Inkubation 14 Stunden nach Hepatektomie

Auffallend ist der steile Anstieg des Anteils in den Histogrammen links vom 2c Gipfel, also die Zunahme von Zelldetritus (Abb. 17a). Die hier angegebenen Werte für den Zellschutt beziehen sich auf die ausgezählte Gesamtimpulszahl (Counts total). Unter der Vorstellung, daß Zelldetritus in den ersten Versuchsstunden links vom 2c Peak liegt, sind die Werte dieser, wie aller übrigen Histogramme "Zelldetritus-bereinigt", d.h. von der Gesamtimpulszahl wird der Anteil des Zelldetritus abgezogen und dann erst der prozentuale Anteil der übrigen Histogrammabschnitte berechnet.

Die Zunahme des Zelldetritus bei steigender Inkubationsdauer in der Zellsuspension zeigt sich auch nach Ethidiumbromid-Färbung im Fluoreszenzmikroskop.

Die Gesamtzahl der Zellen in den Histogrammabschnitten e und f nehmen um mehr als das Doppelte zu (von 20 bis 50%), (Abb. 17a), die größte Zunahme liegt eindeutig zwischen 2c und 4c Zellen (e), (Abb. 17b). Im Histogrammbereich e2, d.h. S-Phasen-Bereich vor 4c, ist die steilste Zunahme bis zur 3. Versuchsstunde zu verzeichnen. Dennoch kommt es im Verlauf der Inkubation nicht zu einer Zunahme des 4c-Zellen-Anteils (b), (Abb. 17a) am gesamten Histogramm. Es zeigt vielmehr die 4c-Kurve einen deutlichen Abfall von 50% auf 22%. Nur der 2c-Peak zeigt nach einem anfänglichen leichten Abfall und einem Plateau zwischen der 2. bis 5. Versuchsstunde einen erneuten Anstieg ungefähr bis auf die Ausgangswerte, ist also beinahe konstant.

Der 8c Zellen-Bereich der oktoploiden Zellen bleibt während der ganzen Versuchsdauer konstant auf sehr niedrigem Niveau (Abb. 17a), dazu verläuft die Kurve f (Zellen zwischen 4c und 8c) ebenso auf niedrigem Niveau konstant horizontal. Auch ihre Teilkurven f1 und f2 zeigen diesen Verlauf (Abb. 17b).

Unter der Voraussetzung, daß in dem oben dargestellten In-

kubationssystem wirklich biologische Vorgänge in vitro ablaufen, könnte der Verlauf der Histogramme so interpretiert werden:
Neben einem hohen Anteil von Zellen, die während der Inkubation desintegrieren, beginnen bis zur 4. Inkubationsstunde (= 18. Stunde nach 2/3-Hepatektomie) etwa 50% aller noch vitalen Zellen mit der DNA-Synthese.
Bis zur 7. Inkubationsstunde (= 21. Stunde nach Hepatektomie) liegt dieser Zellanteil konstant um 50%. Im Vergleich zu den in vivo Ergebnissen (99) fällt hierbei der höhere Anteil an DNA-synthetisierenden Zellen in vitro, der frühere Beginn und steilere Anstieg der DNA-Synthese auf, schon zu einem Zeitpunkt, bei dem in vivo die Umschaltung von langsamem auf schnellen Proliferationsmodus nicht stattgefunden hat (99). Diese DNA-synthetisierenden Zellen befinden sich vorwiegend zwischen den diploiden und tetraploiden Zellen. Bei den Kurven für die frühe und späte S-Phase findet sich auffälligerweise ein erster Peak nach 2 Stunden Inkubation schon in der späten S-Phase, die Kurve der frühen S-Phase erreicht erst in der 5. Versuchsstunde ihren maximalen Punkt.

3.3.8. Leberzellhistogramme nach 2/3-Hepatektomie und HU-Infusion in verschiedenen Abständen nach HU-Infusionsende isoliert

Auch für die ICP-Auswertung werden wie bei Autoradiographie und Scintillationsmessung die zeitlichen Abstände zwischen dem Ende der HU-Infusion und dem Beginn der Zellisolation variiert. Die Dauer der Zellisolation (Leberperfusion und Isolation der Zellen) liegt hierbei für alle Versuche zwischen 70 - 75 Minuten. Die folgenden Zeitangaben betreffen den Zeitraum zwischen HU-Infusionsende und der ersten ICP-Meßprobe je eines Versuches:

$1^{0}10'$, $1^{0}20'$, 2^{0}, $2^{0}40'$, $3^{0}35'$, $5^{0}35'$, $6^{0}20'$, $7^{0}25'$, $8^{0}40'$.

Jeder Meßpunkt der Abb. 18a und 18b entpricht den jeweiligen Histogrammabschnitten von isolierten Leberzellen ei-

nes Versuchstieres unmittelbar nach der Zellisolation, zunächst ohne weitere Zellinkubation. Die Kurve des S-Phase-Bereiches der Abb. 18 kann daher am ehesten mit den von RABES und Mitarbeitern ermittelten Ergebnissen verglichen werden.
Der Anteil an Zellen mit einem DNA-Gehalt über 8c bleibt hier unberücksichtigt, da die Auswertung hier nur sehr geringe Werte ergab. Dies ist sowohl auswertungsmethodisch als auch meßtechnisch bedingt.

Ausgehend von etwa 40% Zellanteil im S-Phasenbereich 1 Stunde nach HU-Block-Ende befinden sich zwischen der 2. und 3. Stunde nach HU-Block-Ende etwas mehr als 50% aller Zellen in der Synthesephase (Abb. 18a), bis zur 6.5. Stunde fällt dieser Wert ab auf 10%, mit einem anschließenden nochmaligen Anstieg auf 30% bis zur 8,5. Stunde.

Am eindrucksvollsten ist der Anstieg der 8c Zellen von ca. 1,5 Stunden nach HU bis beinahe 40% ebenfalls in der 6,5. Stunde. Diese Zunahme an Zellen mit oktoploidem DNA-Gehalt kommt am ehesten durch die DNA-Synthese der Zellen mit tetraploidem DNA-Gehalt zustande (4c Zellen), die sich scheinbar im Verlauf des Zellzyklus bis kurz vor der Zellteilung am 8c Peak anhäufen (f1, f2, Abb. 18b). Dies zeigt sich an den Teilkurven f1 und f2 (Abb. 18b), die, um 1,5 Stunden versetzt einen deutlichen Anstieg zeigen und von der Höhe sowie dem Kurvenverlauf die Gesamtkurve ef weitgehend bestimmen.
Der Verlauf der Kurve der S-Phase zwischen 2c und 4c (e) läßt eine der Kurve f, bzw. f1 und f2 ähnliche Bewegung nicht erkennen (Abb. 18b), die Kurve e2 verläuft bis zur 7,5. Stunde fast horizontal und zeigt in der letzten Stunde den gleichen parallelen Anstieg wie die Kurven f1 und f2.

Demgegenüber steht aber nun ein geringer Abfall der Kurven im 4c Bereich von 26% in der ersten Stunde bis 17% nach der 3,5. Stunde, der dann wieder in einen wellenartigen Anstieg zwischen 20 und 25% übergeht. Bis zur 5,5.

Stunde geht die Kurve des 2c Peak mit der 4c Kurve parallel. Es kommt dann in der 7,5. Stunde noch einmal zu einem Gipfel von 2c Zellen (40%), während die 4c Kurve etwa horizontal verläuft.

Eine Beurteilung der Kurve in der frühen S-Phase zwischen 2c und 4c (e1) scheint am schwierigsten zu sein (Abb.18b). Es fällt jedoch auf, daß die Kurve zwei, wenn auch kleine Gipfel hat. Der erste liegt bei der 1,5. Stunde, somit nur 30 Minuten vor dem Gipfel f1.
Ein zweiter Gipfel liegt in der 3,5. Stunde, dort, wo auch der Gipfel von f2 liegt. Es erscheint unlogisch, daß die S-Phase zwischen 2c und 4c in zwei Wellen verläuft, wobei gleichzeitig der Teil der Zellen, die in die späte S-Phase eintreten, nur ganz unwesentlich zunimmt. Schon eher scheint zumindest bei der Kurve der Zellen zwischen 2c und 4c ein Auswertungs- oder/und meßtechnischer Fehler vorzuliegen.
Zusammenfassend lassen sich die Histogramme von vorbehandelten Leberzellen unmittelbar nach Zellisolation, deren Ergebnisse entsprechend der einzelnen Abschnitte in den Abb. 18a und 18b dargestellt sind, am ehesten mit den in vivo ermittelten Ergebnissen vergleichen: Eine maximale DNA-Synthese mit bis zu 50% aller isolierten Zellen zeigt sich wie in vivo zwischen der 2. und 3. Stunde nach HU-Infusionsende. Anschließend nimmt der Anteil der DNA-synthetisierenden Zellen bis auf 10% ab (6,5. Stunde nach HU). Aus dem Kurvenverlauf können Schlüsse auf den Einfluß von Zellisolation und Verhalten der Zellen in vitro gezogen werden.

3.3.9. Stündliche Histogramme isolierter und inkubierter Leberzellen nach Hepatektomie und 25-stündiger HU-Infusion

Die Inkubationsdauer beträgt bei 6 Versuchen zwischen 4 - 6 Stunden (78-2,3,4,5,6,8), bei 2 Versuchen 8 Stunden (78-7,9).

Zelldetritus

Von einer Ausnahme abgesehen (Versuch 78-4) ist der Anteil von Zelldetritus am Histogramm bei Inkubationsbeginn, wie zu erwarten, am geringsten im Vergleich zu den weiteren Untersuchungsproben nach Inkubation (Abb. 19). Die Impulszahl des Zelldetritus läßt sich, wie vielfach beobachtet werden konnte, durch technische Manipulationen, z.B. Behandlung der Zellsuspension mit Ultraschall, oder durch Zunahme des Zeitintervalls zwischen Fertigstellung der Untersuchungsproben und Messung am ICP erhöhen. Es fällt bei der Betrachtung der Histogramme mit zunehmender Inkubationsdauer auf, daß noch zu Beginn der Zellinkubation eine deutliche Trennung zwischen dem Zelldetritus-Bereich und dem 2c Peak im Histogramm möglich ist, während mit zunehmender Inkubationsdauer der Bereich des Zelldetritus auf der Abszisse immer mehr nach rechts, enger an den 2c Peak rückt. Eine Trennung kann dann offensichtlich nur durch das hier angewandte Auswertungssystem erreicht werden. Dies gilt für alle Versuche und ist exemplarisch in den Histogrammen der Abb. 20 dargestellt. Auch zeigt ein Vergleich der Histogramme ohne (78-40, Abb. 21a) bzw. nach 3-stündiger Zellinkubation (78-33, Abb. 21b) zwar den gleichen prozentualen Anteil an Zelldetritus (ca. 19%), bei dem Histogramm 78-40 erscheint der Hauptteil des Detritus aber deutlich vom 2c Peak abgetrennt. Die dort registrierten Impulse stellen Zelldetritus mit eindeutig geringerem DNA-Gehalt als die diploiden Zellen dar. Im Histogramm 78-33 liegen die Impulse des Zelldetritus vor 2c (d) und der diploiden Zellen wesentlich enger auf der Abszisse zusammen.
Das bedeutet nicht, daß der Anteil an Zelldetritus nur durch Fragmente diploider Zellen zunimmt. Die Auswertung der weiteren Histogramme legt vielmehr nahe, daß zunehmend auch Zellfragmente aus dem Anteil der tetra- und oktoploiden Zellen und in den Zwischenbereichen entstehen, die sich

dann, entsprechend der Zellfragmentgröße entlang der gesamten Abszisse auch links vom 2c Peak anhäufen. Die Bedeutung dieses wichtigen Phänomens soll in der Gesamtbeurteilung besonderes Gewicht erhalten.
Zur Zunahme des Zelldetritus bei den meisten Versuchen kommt es auch unabhängig davon, zu welchem Zeitpunkt die Zellen nach Beendigung der HU-Infusion isoliert werden.

Die Gruppe von Versuchen, deren Zellinkubationsbeginn zwischen der 1,5 - 5. Stunde nach HU-Infusionsende liegt (Abb. 19, zeigt eine durchschnittliche Zunahme des Zelldetritus von 36,9% während der Zellinkubation. Bei zwei Versuchen mit Inkubationsbeginn 6,5 bzw. 7,5 Stunden nach HU-Infusionsende nimmt der Zelldetritus nur um 26 bzw. 18% zu, mit steigender Inkubationsdauer zeigt der Kurvenverlauf sogar eine Abnahme des Zelldetritus (bes. Versuch 78-6). Liegt der Inkubationsbeginn 8 Stunden 40 Minuten nach HU-Infusionsende, so schwankt der Anteil des Zelldetritus während einer 4-stündigen Zellinkubation zwischen 8 und 20%.
Diese Ergebnisse zeigen, daß der Anteil des Zelldetritus links vom diploiden Zellpeak mit steigender Inkubationsdauer zunimmt.
Dabei scheint Höhe und Steilheit des Kurvenabstiegs auch vom Zeitpunkt der Zellisolation abhängig zu sein. Die Zellen mit hoher DNA-Syntheseaktivität überstehen offensichtlich Zellisolation und in vitro-Inkubation weniger gut als die Zellen, die zum Zeitpunkt der Isolation das Maximum ihrer DNA-Synthese schon überschritten haben.

Die hier dargestellte Zunahme beruht bei den ausgewerteten Histogrammen in keinem Fall auf der Behandlung der Zellsuspension mit Ultraschall, wenngleich beobachtet werden kann, daß durch eben diese Behandlung, die in der Literatur immer wieder zur Herstellung einer geeigneten Einzelzellsuspension angegeben wird, auch der Anteil an Zelldetritus deutlich zunehmen kann.

S-Phase-Bereich 2c - 4c - 8c Histogrammabschnitte

Wie der Zelldetritus werden auch die übrigen Histogrammabschnitte und ihre Veränderungen während der Inkubation in folgenden Abbildungen dargestellt:
Abb. 22: Gesamter S-Phasebereich (Zwischenbereich)
Abb. 23: 2c-Bereich der diploiden Zellen
Abb. 24: 4c-Bereich der tetraploiden Zellen
Abb. 25: 8c-Bereich der tetraploiden Zellen

Die Werte der einzelnen Zwischenbereiche (zwischen 2c und 4c) und f (zwischen 4c und 8c) sowie die dazu gehörenden Abschnitte des frühen (e1, f1) bzw. späten (e2, f2) S-Phasebereichs sind für alle Versuche in Tabelle 6 aufgeführt.

Zwischenbereich ef (S-Phase, Abb. 22)

Die Versuche können in 2 Gruppen eingeteilt werden:
4 Versuche mit Inkubationsbeginn zwischen der 1,5. bis zur 3,5. Stunde nach HU-Infusionsende (78-2,3,8,7) zeigen, daß die maximale DNA-Synthese nach HU und Zellisolation schon zwischen der 3. und 6. Stunde nach HU erreicht wäre und von geringen Schwankungen abgesehen, bis zur 10,5. Stunde nach HU konstant hoch wäre. 45 - 60% aller Zellen befänden sich in diesem Zeitraum in der DNA-Synthese.

In der 2. Gruppe der Versuche mit längerem Intervall zwischen HU-Blockende und Zellinkubationsbeginn (5,5. - 8,5. Stunde, 78-9,6,5,4) ist die Zahl der Zellen in den Zwischenbereichen der Histogramme zu Beginn der Zellinkubation wesentlich geringer. Sie liegt zwischen 10 und 27%. Es folgt dann in den ersten Versuchsstunden eine steile Zunahme der Zellzahl im Zwischenbereich bis auf Werte zwischen 40 - 70%. In den letzten Versuchsstunden einzelner Versuche (bes. 78-9,5,4) kommt es dann zu einer Abnahme dieses Anteils auf ca. 45%. Das würde bedeuten, daß die Zahl der Zellen im gesamten Zwischenbereich in der ersten Versuchsgruppe konstant zwischen 40 - 65% liegt, bei spä-

tem Inkubationsbeginn käme es sogar noch bis zur 11,5. Stunde nach HU-Infusionsende zu einer erheblichen Zunahme DNA-synthetisierender Zellen bis auf 65% aller Zellen am Gesamthistogramm.

Die Werte für die einzelnen Zwischenbereiche e, e1, e2 und f, f1, f2 sind in Tabelle 6 aufgeführt. Alle Versuche zeigen während der Inkubation eine Zunahme des Zwischenbereiches e bzw. e1, e2, während die ersten Versuche 78-2,3,8,7 eine stetige Abnahme des Bereiches f bzw. f1, f2 aufweisen. Entsprechende Übergänge der Zellanteile von den frühen zu den späten Zwischenbereichen (e1-e2, f1-f2) sind in keinem der Versuche nachzuweisen. Aus den Histogrammveränderungen der einzelnen Versuche (z.B. Abb. 20) und aus den Zahlenangaben der Tabelle 6 wird vielmehr deutlich, daß die Zunahme des Zwischenbereiches e sowie die Abnahme des Zwischenbereiches f oder auch dessen Zunahme mit einer stetigen Desintegration der Zellen zu erklären ist.

2c-Bereich, diploide Zellen (Abb. 23)

In den ersten Versuchsstunden aller Versuche zeigt sich mit Ausnahme eines Versuches (78-8) ein mehr oder weniger steiler Abfall des diploiden Zellanteils am Gesamthistogramm. In den weiteren Versuchsstunden verlaufen die Kurven ohne klar erkennbare Tendenz teils aufsteigend oder weiter abfallend. Eine weitere Abnahme gerade des diploiden Zellanteils wäre aber zu erwarten, da einerseits in vitro eine Zellmitose in wesentlichem Umfang bei diesen Versuchen nicht zu erwarten ist und die Zunahme des Zwischenbereichs am Histogramm (Abb. 22) eine solche Abnahme voraussetzt.

4c-Bereich, tetraploide Zellen (Abb. 24)

Die Veränderungen im 4c-Bereich entsprechen eher den Vorstellungen, daß einerseits eine Zunahme tetraploider Zellen durch die DNA-Synthese diploider Zellen zu erwarten

ist, andererseits tetraploide Zellen in die DNA-Synthese in Richtung auf oktoploide Zellen eintreten. Die einzelnen Kurven des 4c-Bereiches liegen vorwiegend in einem Bereich zwischen 15 - 27% Anteil am Gesamthistogramm. Der einzelne Kurvenverlauf ist allein anhand der Abb. 24 nicht zu interpretieren. Zellzyklus-kinetische Unterschiede zwischen Zellen der späten S-Phase nach 2c bzw. der frühen S-Phase nach 4c könnten hier eine Rolle spielen.

8c-Bereich, oktoploide Zellen, (Abb. 25)

Eine Zunahme des oktoploiden Zellanteils am Gesamthistogramm, wie er sich aus der DNA-Synthese tetraploider Zellen ergeben würde, ist in keinem Versuch zu verzeichnen. Die Kurven der oktoploiden Zellen verlaufen bei niedrigen Werten entweder horizontal (78-2,3) oder zeigen bei höheren Anfangswerten einen weiteren Kurvenabfall (78-8,7). Ein entsprechendes Verhalten zeigen auch die jeweils dazugehörenden f2-Bereiche (Tab. 6). Das bedeutet aber, daß die Zellen beider Bereiche mit zunehmender Inkubationsdauer desintegrieren und dann offensichtlich als Zelldetritus in den Histogrammabschnitten links von f/2-8c erscheinen (s. a. Abb. 20).

Zusammenfassung

Der Vergleich von Leberzellhistogrammen in zunehmenden Abständen nach HU-Infusionsende zeigt für so vorbehandelte Zellen unmittelbar nach Zellisolation einen Kurvenverlauf, der hinsichtlich des S-Phasebereiches den in vivo Ergebnissen nahekommt.
Allen Versuchen ist mit steigender Inkubationsdauer die Zunahme des vor dem diploiden Zellpeak gelegenen Zelldetritus gemeinsam. Er nimmt bei Versuchen mit frühem Isolationsbeginn nach HU-Infusionsende besonders stark zu, d.h. wenn die Leberzellen während ihrer höchsten DNA-Syn-

theseaktivität isoliert werden. Bei späterem Isolationsbeginn nach HU ist diese Zunahme nicht so eindeutig.

In allen Versuchen liegt der Anteil der Zellen in den Gesamtzwischenbereichen ef (S-Phasebereich) scheinbar zwischen 40 - 65%. In den Versuchen mit längerem Abstand zwischen HU-Infusionsende und Zellinkubation wird dieser Wert durch einen steilen Kurvenanstieg erreicht, während die Versuche mit entsprechend kürzeren Zeitabständen von Anfang an für den S-Phasebereich diese Werte zeigen.

Der Verlauf der Kurven der oktoploiden Zellen (8c), die Einzelergebnisse der Teilabschnitte e, f bzw. e1, e2, f2 und die Kurven der tetraploiden Zellen lassen jedoch den Schluß zu, daß es bei den Versuchen mit Inkubation der isolierten Leberzellen während der Zellinkubation nicht zu einer echten DNA-Synthese kommt. Vielmehr beruht der Kurvenanstieg aller S-Phasekurven auf einer zunehmenden Desintegration der Zellen mit Zunahme des Zelldetritus, der sich über das gesamte Histogramm verteilt.

Tabelle 6:

	e	e1	e2	f	f1	f2
78/10	12,5	9,2	3,2	26,6	15,3	11,3
20	17,9	15,0	2,8	28,0	17,2	10,8
21						
22	25,7	12,7	13,0	23,4	17,8	5,6
23	46,0	16,0	30,0	10,2	5,1	5,1
24	46,0	19,5	26,3	15,6	9,3	6,4
25	50,0	23,5	26,3	14,5	8,1	6,5
26	48,5	27,9	20,5	12,6	7,1	5,5

	e	e1	e2	f	f1	f2
78/30	10,6	9,3	1,2	33,7	28,6	5,1
31	11,9	8,4	3,4	32,4	29,7	2,7
32	28,2	5,4	22,8	24,1	19,0	5,1
33	34,0	14,0	20,0	22,6	18,2	4,4
34	35,4	22,4	12,9	23,0	17,3	5,7
35	32,7	19,1	13,5	18,3	12,9	5,4
36	28,6	15,7	13,0	17,6	13,2	4,5

	e	e1	e2	f	f1	f2
78/80	7,2	4,7	2,5	45,3	24,5	20,8
81	10,4	7,3	3,1	44,4	23,7	20,7
82	13,4	5,6	7,8	33,6	21,3	12,3
83	24,4	6,3	18,1	28,0	19,6	8,4
84	35,0	12,8	24,2	20,3	11,2	9,1
85	32,7	15,0	17,7	20,6	11,6	9,0
86	36,3	20,2	16,1	15,3	7,7	7,6

Zwischen-(S-Phase)-bereiche(s.Abb 22)und ihre Aufteilung in frühe (e_1/f_1) bzw späte (e_2/f_2)S-phase.
Leberzellen nach Hepatektomie und HU-Infusion in zunehmenden Abständen nach HU-Ende isoliert und in vitro inkubiert.Inkubationsdauer 4-7 Stunden.
Zahlenangaben in Prozenten.

	e	e1	e2	f	f1	f2
78/70	16,5	13,6	2,9	29,3	5,0	24,3
71	18,4	13,3	5,1	35,2	10,1	25,0
72	26,1	8,6	17,4	36,9	15,6	21,3
73	29,5	19,0	10,4	21,7	6,3	15,5
74	28,3	20,1	8,2	19,7	5,7	14,0
75	29,6	17,6	12,0	19,3	6,9	12,4
76	32,9	18,7	14,2	15,0	5,0	90,0
77	39,3	25,8	13,4	13,2	5,2	8,0

	e	e1	e2	f	f1	f2
78/90	9,2	5,6	3,6	12,4	4,2	8,2
91	16,4	1,5	15,1	31,9	1,2	30,7
92	25,4	8,3	17,8	36,1	7,0	29,1
93	22,9	10,2	12,7	33,6	14,2	19,4
94	29,1	9,0	20,1	30,0	10,5	19,5
95	26,5	9,4	17,1	19,1	5,3	13,8
96	30,3	13,8	16,5	20,4	7,0	13,4
97	32,9	14,8	18,1	12,1	4,4	7,7

	e	e1	e2	f	f1	f2
70/60	8,7	6,9	1,8	1,3	1,3	
61	6,8	2,3	4,5	15,0	2,2	12,8
62	19,9	14,7	5,2	10,3	2,1	8,2
63	12,9	3,7	9,2	25,1	2,2	22,9
64	12,2	3,9	8,3	22,2	3,2	19,0
65	18,4	10,0	8,4	20,7	2,4	18,3

	e	e1	e2	f	f1	f2
78/50	13,9	11,8	2,1	1,3	1,1	0,2
51	11,1	9,8	1,3	2,8	1,4	1,4
52	9,6	5,9	3,7	4,0	1,4	2,6
53	17,4	13,1	4,3	4,2	2,3	1,9
54	28,3	7,0	21,3	40,2	3,9	36,3
55	30,7	18,7	12,0	16,4	5,1	11,3

	e	e1	e2	f	f1	f2
78/40	16,5	8,8	7,7	12,2	6,9	5,3
41						
42	17,9	6,1	11,8	21,5	3,8	17,7
43	29,0	5,6	23,4	27,1	6,5	20,6
44	21,3	6,6	14,7	24,8	5,1	19,7

4. Diskussion

Zu Beginn der Erörterung der hier vorgelegten Ergebnisse erscheint es notwendig, noch einmal folgende Punkte hervorzuheben:

Hauptziel der hier vorgelegten Arbeit ist es, zu untersuchen, ob bei Anwendung des von RABES und Mitarbeitern entwickelten Systems der durch Hydroxyharnstoff synchronisierten Leber die Leberzellen nach Beendigung des HU-Blockes auch unter in vitro-Verhältnissen ein ähnliches Verhalten wie in vivo zeigen. Bei der Durchführung der Untersuchung ergeben sich dabei folgende Schwerpunkte:

1. Isolation der Zellen nach 2/3-Hepatektomie mit anschliessender HU-Infusion über 25 Stunden.
2. Vergleich der durch Autoradiographie und Scintillationsmessung erzielten Ergebnisse mit den in vivo erreichten Ergebnissen.
3. Durchführung der Versuche mit dem Impulscytophotometer, die Auswertung der so ermittelten Ergebnisse und deren Aussagekraft.

Für den Vergleich dieser Ergebnisse mit anderen Angaben über Leberzellen in vivo und in vitro gilt jedoch folgende Voraussetzung:

- Bei der Isolation der Leberzellen handelt es sich um Zellen, die in vivo einer partiellen Hepatektomie als Stimulationsreiz und außerdem einer anschließenden HU-Infusion unterzogen wurden.
- Die Autoradiographie- und Scintillationsergebnisse wurden mit Zellen durchgeführt, die zur oben beschriebenen Behandlung (Hepatektomie, HU-Infusion) noch zusätzlich durch die Zellisolation aus ihrer natürlichen Umgebung entfernt und in ein künstliches und damit auch insuffizientes Milieu gebracht wurden.

4.1. Technik der Perfusion und Zellisolation

Bei der oben beschriebenen Perfusionstechnik werden die Angaben von Berry und Friend, Seglen , Howard und anderen berücksichtigt (51-53, 66/77, 77-79). Es war nicht das Ziel, eine neue Perfusionsmethode zu entwickeln. Vielmehr wurde bei der Durchführung des beschriebenen Perfusionssystems erprobt, wie weit bei dem Modell der 2/3-hepatektomierten Ratte möglichst gute Ergebnisse, verglichen mit den oben zitierten Autoren, zu erzielen sind.

Am effektivsten erweist sich hierbei die Enzymperfusion in situ, da das Perfusionssystem an die anatomisch schon vorgegebenen Strukturen wie Vena cava inferior und rechter Herzvorhof angeschlossen werden kann. Es entfällt somit die Freipräparation des Organs, bei der auf die genaue Erhaltung jener anatomischen Strukturen und deren Unversehrtheit besonders Wert hätte gelegt werden müssen.

Bezüglich der Perfusion der Leber scheint die 2-Stufen-Methode von Seglen (77, 78, 79) für die Durchführung dieser Versuche am geeignetsten zu sein. Diese 2-Stufen-Methode ist von Seglen weiterentwickelt worden. In den Versuchen dieser Arbeit wird aber auf die Freipräparation der Leber zum Zwecke der eigentlichen Enzymperfusion verzichtet. Die Vorperfusion mit Ca^{++}-Mg^{++}-freier Hanks-Lösung dient hier wie bei Seglen zum Freispülen der Leber von Blut sowie der Entfernung von Ca^{++}-Jonen (78). Dabei reichen 170 ml der Ca^{++}-Mg^{++}-freien Hanks-Lösung mit einer Perfusionsrate von ca. 23 ml/min. für die Vorperfusionsdauer von ca. 7 Minuten aus. Diese Werte stimmen etwa mit den von Seglen angegebenen Werten (78) überein, in weiteren Arbeiten werden auch höhere Zahlen genannt (79). Nicht zum Ausdruck kommt in den angegebenen Zahlen, daß der Effekt einer konstant gleichen Perfusionsrate nicht die gleiche günstige Wirkung hat wie die langsame Steigerung der Perfusionsrate. Zumindest makroskopisch zeigt sich, daß die vollständige Entblutung der Leber ohne weitere Manipulation mit steigender Perfusionsrate

wesentlich besser gelingt, als wenn von Anfang an die Perfusionsrate sofort den Endwert erreicht hätte. Andererseits können aber bei dem hier durchgeführten Perfusionssystem die hohen Vorperfusionsraten von ca. 50 ml/min (76-79, 53, 68) auch bei freiem Abfluß der Vorperfusionslösung durch die eröffnete obere Hohlvene nicht erreicht werden. Das liegt vor allem daran, daß bei der hier angewandten Methode keine Perfusionspumpe benutzt wird, der Perfusionsdruck also allein durch den hydrostatischen Druck der Flüssigkeitssäule (ca. 50 cm H_2O) erzeugt wird.

Auch die Rate der Enzymperfusion, die bei diesem Modell zur Anwendung kommt, unterscheidet sich wesentlich von den sonst in der Literatur berichteten (77, 78, 79, 34) Werten. Bei der Leber, die 2/3-hepatektomiert und über 25 Stunden HU-infundiert ist, scheint eine wesentlich langsamere Perfusionsrate (7,4 ml/min) bessere Ergebnisse hinsichtlich der Zellvitalität als auch der Zellzahl zu ergeben (s.a. (26), Tab. 1c). Aber auch die längere Perfusionsdauer ist ein wichtiger Faktor, sie scheint die Wirkung der Collagenase zu verbessern und damit die Isolation intakter Zellen ohne mechanische Manipulation zu ermöglichen. Im Vergleich zu den sonst berichteten höheren Durchflußraten der Enzymlösung mit oder ohne Rezirkulation, die bei ca. 50 ml/min liegen (53, 67, 79), bedarf die durch Hepatektomie und HU-Infusion beeinträchtigte Leber schon bei der Isolation einer schonenderen Behandlung, d.h. niedrigere Perfusionsraten bei längeren Perfusionszeiten.

4.1.1. Zellvitalität

Die Beurteilung der verschiedenen Perfusionsmodifikationen erfolgt in der vorgelegten Arbeit, ähnlich wie in der entsprechenden Literatur, an Hand der Zellvitalität und Zahl isolierter Zellen. Weitergehende Prüfungen der Zellintegrität, wie etwa elektronenmikroskopische Untersuchungen oder die Prüfung biochemischer Parameter, wurden bei diesen Ver-

suchen nicht durchgeführt, da die Prüfung der Zellvitalität an Hand des Trypanblau-negativ-Index in guter Korrelation mit der morphologisch-biochemischen Zellintegrität steht (26, 74/34/53/75/68).

Daß bei dem eigentlichen Versuchsmodell der Leberzellen nach partieller Hepatektomie und HU-Infusion kein höherer Anteil an vitalen Zellen erreicht wird, liegt nicht nur an den Perfusionsbedingungen. Denn für unbehandelte Leberzellen werden in unserem System Werte erreicht, die im wesentlichen mit den Angaben in der Literatur übereinstimmen. Vielmehr zeigt sich an dieser Stelle erstmals deutlich, welche Beeinträchtigung offensichtlich partielle Hepatektomie und HU-Behandlung auf die Leberzellen ausüben. Die Veränderung der Zellen nach Hepatektomie allein (siehe Übersicht bei Grundmann) sowie die Wirkung von HU auf die Zellen - Hemmung der DNA-Synthese, fortlaufende Synthese von RNA und Proteinen, eventuelle Beeinträchtigung der Zellmembranpermeabilität - können offensichtlich unter in vivo-Verhältnissen weitgehend wieder ausgeglichen werden, während dies nach Isolation der einzelnen Zellen nur noch beschränkt möglich ist.

Gerade die Versuche mit regenerierenden Leberzellen (93, 28, 96, 97), mit regenerierenden und HU-vorbehandelten Leberzellen in vivo (95) sowie unter bestimmten Voraussetzungen (längere Zeitspanne zwischen HU-Ende und Zellisolation) mit regenerierenden Leberzellen in vitro (26), legen die Fähigkeit der Leberzellen zum Wiedererreichen eines voll funktionsfähigen Zustandes nahe.

Auch die Versuche, die in Tabelle 2b dargestellt sind, zeigen den Einfluß der Hepatektomie allein in zunehmenden Zeitabständen nach dem Eingriff: wenn ungefähr 30% aller Leberzellen in der 12. bis 14. Stunde nach Hepatektomie vor einer DNA-Synthese stehen, können unmittelbar vor Beginn dieser S-Phase nur 53 bzw. 68% der Leberzellen als intakte Zellen isoliert werden, d.h. die Leberzellen zeigen erhöhte

Empfindlichkeit im Stadium der Vorbereitung für eine DNA-Synthese, der späten G_1-Phase. Es kann hier keine Aussage darüber gemacht werden, ob ausschließlich Zellen, die in der 12. bis 14. Stunde nach Hepatektomie am Beginn der S-Phase stehen, zu den Trypanblau-positiven zu zählen sind, eine höhere Vulnerabilität gerade zu diesem Zeitpunkt ist aber anzunehmen (26).

Mit zunehmendem zeitlichen Abstand von der Hepatektomie steigt die Möglichkeit, vermehrt intakte Zellen zu isolieren. Den Ergebnissen wie bei unbehandelten Leberzellen (2a) kommen am nächsten die Zellen, die 3 Stunden nach Hepatektomie oder erst 48 bzw. 72 Stunden später isoliert werden.

Zu erwähnen ist an dieser Stelle, daß die Reihenfolge der Durchführung der einzelnen Versuche nicht mit dem zeitlichen Abstand von der Hepatektomie parallel geht, um systematische Fehler durch methodische Verbesserungen zu vermeiden. Noch niedrigere Werte für die Zellvitalität werden bei den Versuchen erreicht, in denen die Tiere sowohl hepatektomiert als auch HU-infundiert werden. Ohne erkennbare Tendenz liegt hier der Mittelwert an intakt isolierten Zellen um ca. 50%. Bei einer Halbwertszeit der Serumkonzentrationen an HU von etwa 80 Minuten nach Beendigung der HU-Infusionen (95) ist die Leberzelle auch bis zur 9. Stunde nach Infusion bei gleichzeitig beginnender DNA-Synthese, jedoch unabhängig von dieser, gleichbleibend empfindlich gegenüber der Isolierung aus dem Zellverband.
Freilich läßt sich auch hier nicht sicher das Ausmaß der einzelnen Faktoren (Hepatektomie, HU) an der Beeinträchtigung der Zellintegrität gegeneinander beurteilen. Die Durchsicht der Zellausstriche ergibt schon mikroskopisch sichtbare Veränderungen bei Zellen von Tieren, die nur hepatektomiert wurden. Die Zellen scheinen in ihrem Cytoplasma und im Kern nicht mehr normal strukturiert zu sein. Zunehmend sind besonders die Zellgrenzen der einzelnen Zelle weniger gut abzugrenzen. Ähnliche Veränderungen werden von Grund-

mann (101) und Schmidkonz (102) hinsichtlich der Größenzunahme besonders des Cytoplasmas durch hydropische Schwellung nach Hepatektomie und HU beschrieben. Diese Veränderungen zeigen fast einheitlich alle Zellen, die nur einer Hepatektomie unterzogen wurden. Viel bunter erscheint das Zellbild in den Ausstrichen nach 2/3-Hepatektomie und HU-Infusion. Es zeigen sich von lichtmikroskopisch weitgehend "intakten Zellen" mit großem Kern und deutlich abgrenzbarem Cytoplasma alle Übergänge bis zu fast aufgelösten Zellen, deren Kern und Cytoplasma durch Flüssigkeitsstrom weitgehend hydropisch verquollen sind, neben anderen Zellen, die bei normaler Zellform einen pyknotischen kleinen Zellkern aufweisen.

Daß es sich bei beiden Zelluntergangsformen nicht um Erscheinungen bei Nicht-Hepatozyten handelt, beweist die Tatsache, daß diese Veränderungen auch bei zweikernigen Zellen auftreten. Dieses bunte Zellbild bei den Versuchen mit Hepatektomie und HU-Infusion weist mit darauf hin, daß die Zellen nach Beendigung der HU-Infusion doch nicht alle im gleichen Ausmaß auf die Beeinträchtigung durch die Zellisolation reagieren. Nach Schmidkonz et al sind hier Unterschiede bezüglich der HU-Wirkung durch "unbalanced growth" entsprechend der Lokalisation der Zellen im Lobulus zu beobachten (102).

4.1.2. Zellzahl

Von der erreichten Zellzahl her kann die Perfusionsmethode für das vorliegende Versuchsmodell als genügend beurteilt werden (26, 29, 68). Mit einer mittleren Zellzahl von 8 x 10^7, die pro Tier isoliert werden, können bei entsprechender Versuchsplanung von einem Tier Untersuchungen in ausreichender Zahl durchgeführt werden. Zu bemerken ist, daß auf eine mechanische Manipulation weitgehend verzichtet werden kann. Die in Tabelle 2 angegebenen Gesamtzellzahlen zeigen dabei, daß hinsichtlich des Versuchsaufbaues (Isolation unmittelbar nach Hepatektomie und zunehmender Ab-

stand zwischen Isolation und HU-Block-Ende keine deutlichen Unterschiede in der Gesamtzellzahl gefunden werden.

4.2. Inkubationsbedingungen, Vitalitäts- und pH-Veränderungen während der Inkubation

In Versuchen mit Leberzellen sind bisher schon, je nach Fragestellung, verschiedene Inkubationssysteme erprobt worden (3, 8, 12, 16, 26, 35). Dabei spielt bei Monolayerkulturen oder Leberzellexplantaten der Zeitfaktor keine so wichtige Rolle, eine Anpassung an das veränderte künstliche Mikromilieu für die Leberzellen scheint möglich.

Da aber gerade in der hier angegebenen Versuchsanordnung frühzeitige Veränderungen hinsichtlich der DNA-Synthese nach HU erfaßt werden sollen, wird für diese Versuche die Form der Leberzellsuspension in einem 37°C-Schüttelbad gewählt. Dabei muß zwar eine Beeinträchtigung der Zellintegrität schon allein durch den Schüttelvorgang in Kauf genommen werden. Vor der zeitlichen Versuchsplanung ist es jedoch nötig, die isolierten Zellen einzeln in Suspension zu halten. Es soll dadurch ein gleichbleibender Kontakt zwischen einzelner Zelle und Kulturmedium, insbesondere dem radioaktiven Thymidin über die ganze Versuchsdauer ereicht werden.
Bei den Ergebnissen der Zellsuspensionen muß berücksichtigt werden, daß hier Durchschnittsergebnisse erzielt werden, da sich die Suspensionen aus Zellen zusammensetzen, die auch noch nach Synchronisation durch Hepatektomie und HU ein unterschiedliches Proliferationsverhalten zeigen (95, 100). Auch die hier schon vorher erörterten (makroskopisch sichtbaren Unterschiede der Zellen sowie die unterschiedliche Vitalität der Zellen nach Hepatektomie und HU gehen in die Ergebnisse der Zellsuspensionen wesentlich mehr ein, als etwa in Versuchen mit Monolayern oder Explantaten, die ja immer eine Form der Zellselektion darstellen können (16).

Als Kulturmedium wird im wesentlichen unverändert das schon

bewährte und modifizierte Medium TCM 199 benutzt (12). Seine Brauchbarkeit ist auch bei isolierten Zellkernen nachgewiesen worden (113).

Als wesentlicher Nachteil der angewandten Kulturmethode stellt sich der rasche Abfall des Trypanblau-negativ-Index und ein Absinken des pH-Wertes heraus. Diese Verschlechterung der Inkubationsverhältnisse, die sich auch bei anderen Autoren findet (26, 68, 104), zeigt sich gleichmäßig bei den verschiedenen Versuchsgruppen - unbehandelte Zellen, nach Hepatektomie allein und nach Hepatektomie und HU-Infusion; sie schränkt somit die Brauchbarkeit der Kurzzeitzellsuspenionen im Schüttelbad zunächst ein.

Aus diesem Grund werden die Inkubationszeiten für den einzelnen Versuch so kurz gewählt (ca. 6 Stunden), daß zumindest der pH-Wert in einem Bereich liegt, der, wenn auch eingeschränkt, mit Stoffwechselleistungen der Zellen zu vereinbaren ist (68, 104). Die Ergebnisse der Autoradiographie und der Scintillationsmessung zeigen dementsprechend, daß der Kurvenabfall mehr als nur durch eine Verschlechterung des Inkubationssystems bedingt ist.

Unbeeinflußbar aber bleibt die Abnahme des Vitalitätsindex, was die besonderen Schwierigkeiten adulter Leberzellen für in vitro-Untersuchungen weiter belegt (16).

4.3. Autoradiographie, Scintillationsmessung

Das Modell der Zellsynchronisation in vivo durch 2/3-Hepatektomie und 25-stündige HU-Infusion bewirkt eine fast vollständige Synchronisierung der Leberzellen am Übergang von der G_1-Phase zur S-Phase (95). Über 80% der Zellen sind nach Ende des HU-Blockes in den Autoradiographien markiert, während nach alleiniger Hepatektomie maximal nur etwa 30% markiert sind (28, 97, 99, 100). Auch bei der isolierten Leber, die als ganzes Organ perfundiert wurde (103), sind nach Hepatektomie und HU immerhin noch etwa 24% der Zellen über einen Versuchszeitraum von 5 Stunden markiert. In den

Autoradiographien nach Zellisolation befinden sich aber nur zwischen 14 und 19% aller isolierten Zellen zur 4. Stunde nach HU-Block-Ende in der S-Phase. Die Scintillationsmessung stimmt im Verlauf mit der Autoradiographie weitgehend überein, sie zeigt somit im Vergleich zu den Versuchen mit Zellen, die nach alleiniger Hepatektomie isoliert werden, eine eindeutige Zunahme der Radioaktivität. Die Ergebnisse der Scintillationsmessung lassen sich nicht direkt mit den Kurven der spezifischen DNA-Syntheseaktivität in den in vivo Versuchen (95, 103) vergleichen, da hier die gemessene Countszahl auf die durchschnittlich inkubierte Gesamtzellzahl und nicht auf die isolierte DNA-Menge bezogen ist. Dennoch stimmt die Kurve der Scintillationsmessung (Abb. 1) und die der Autoradiographie (Abb. 6) in ihrem Verlauf und in der Lage des Peaks mit den in vivo-Ergebnissen annähernd überein (95, 103). Im Vergleich zu jenen Ergebnissen fällt aber ein relativ flacher Kurvenabfall bei den Kurven ab der 4. Stunde nach HU-Block-Ende auf, was zunächst von beiden Kurven her für eine deutliche Verlängerung der S-Phase für die in vitro DNA-synthetisierenden Zellen bedeuten würde. Die Kurve der dicht markierten Zellen in der Autoradiographie (Zellen mit mehr als 25 Silberkörnern über dem Zellkern) zeigt aber zumindest für die erste Versuchsgruppe (Abb. 6), daß hier über die ganze Versuchsdauer ca. 50% der markierten Zellen eine hohe DNA-Syntheseaktivität besitzen. Da es sich bei den Versuchen um eine Pulsmarkierung von 30 Minuten handelt, müssen also auch noch in der späteren Versuchsphase (7 - 9 Stunden nach HU) die Hälfte aller markierten Zellen mit relativ hoher DNA-Syntheseaktivität in die S-Phase eintreten. Ein zeitlich gestaffelter Eintritt der Leberzellen entsprechend ihrer Lokalisation im Leberläppchen ist somit auch für in vitro-Ergebnisse anzunehmen, da es zunächst unwahrscheinlich ist, daß durch die Zellisolation die durch HU-Wirkung erzeugte Synchronie vermindert oder aufgehoben ist. Ein solcher zeitlich gestaffelter Eintritt nach Hepatektomie ist

in vivo nachgewiesen worden (27, 88, 97, 100). Eine derartige Annahme kann aber nach den vorliegenden Ergebnissen nur für die Zellen der frühen zeitlichen Isolation nach HU-Infusionsende angenommen werden. Denn in den weiteren Versuchen mit größerem zeitlichen Abstand zwischen HU-Ende und Zellisolation fällt die Zahl der dicht markierten Zellen auf geringe Werte ab. Der gleichzeitig zu beobachtende Abfall der Kurve aller markierten Zellen und der Scintillationsmessung ist nicht, wie schon angeführt, allein auf eine Verschlechterung der Inkubationsbedingungen zurückzuführen, da sich einerseits ein Peak wie in den Abb. 1, 6, 7 in den übrigen Versuchen nicht reproduzieren läßt, andererseits bei unveränderten Versuchsbedingungen in allen weiteren Versuchen nur noch ein Kurvenabfall zu beobachten ist.

Aus diesen Ergebnissen läßt sich annehmen, daß für das hier untersuchte Versuchsmodell ein relativ günstiger Zeitpunkt für die Zellisolation gefunden wurde (0 - 60 Minuten nach Infusionsende), da hier zahlreiche Zellen DNA synthetisieren und die DNA-Syntheseaktivität hohe Werte erreicht.

Dennoch liegen die hier ermittelten Werte signifikant unter den entsprechenden in vivo-Ergebnissen (95, 103). Dafür können folgende Punkte als Erklärung herangezogen werden:

Es muß offensichtlich ausreichend Zeit in vivo zur Verfügung stehen, um unter den Versuchsbedingungen eine DNA-Synthese zu beginnen. Denn eine DNA-Synthese findet in den Leberzellen nicht statt, wenn diese in sehr kurzen Abständen nach Hepatektomie isoliert werden (11, 26, 80), bzw. Organperfusionen in vitro unmittelbar nach HU-Infusionsende begonnen werden.

Die bisher in vivo durchgeführten Versuche mit dem Modell der durch Hepatektomie allein oder durch Hepatektomie und HU-Behandlung synchronisierten Leberzellen (95, 103, 80, 31, 72), sowie die bisherigen in vitro-Versuche mit proliferierenden Leberzellen (11, 26, 19, 34) gehen weitgehend von der Vorstellung aus, daß wesentliche Steuerungsvor-

gänge für das Einsetzen einer DNA-Synthese zeitlich am Übergang der G_1-Phase zur S-Phase liegen, d.h. um die 14. Stunde nach Hepatektomie, bzw. in den ersten Stunden nach HU-Infusionsende. Diese Steuerungsmechanismen, deren Natur weitgehend unbekannt ist, scheinen gegenüber Einflüssen von aussen besonders empfindlich zu sein. Nach den hier vorgelegten Versuchen - hierzu gehören auch die Versuche mit Leberzellisolierung nach Hepatektomie ohne zusätzliche Behandlung - spielt die Beeinträchtigung dieser Steuerungsvorgänge durch äußere Manipulationen, wie etwa eine Zellisolation, eine wesentliche Rolle.

Fehlender Nachweis während 7-stündiger Inkubation von radioaktiver DNA im säurelöslichen Präzipitat von Leberzellen, 14 Stunden nach Hepatektomie isoliert, bestätigen die Meinung anderer Autoren, daß in nennenswertem Umfang in vitro keine DNA-Synthese neu begonnen wird (11, 19, 26, 34). Darüberhinaus führen die Ergebnisse der Leberzellinkubation nach Hepatektomie und HU-Infusion zu folgender Überlegung: Eine nennenswerte neue DNA-Synthese in vitro findet zwar unmittelbar nach der Zellisolation nicht statt, - auch in Leberorganperfusionen in vitro sind nach 7-stündiger HU-Perfusion nur 0,3% aller Zellen radioaktiv markiert (103). Wenn aber nach HU-Ende für die Zellen noch in vivo die Möglichkeit eines DNA-Synthesebeginns bestand, so wird nach Zellisolation die DNA-Synthese in vitro nur in dem Umfang fortgesetzt, wie er bei den vorgelegten Ergebnissen der Autoradiographie zur Darstellung kommt (14 - 20%). Die in derselben Arbeitsgruppe durchgeführten Organperfusionen nach Beendigung der HU-Dauerinfusion legen aber eindeutig die Zunahme der DNA-Synthese auch in vitro nahe (103). Daß die hier isolierten Zellen während einer weitgehend synchron verlaufenden Synthesephase isoliert werden, zeigen nicht nur die in vivo-Versuche, sondern auch die hier vorgelegten ICP-Untersuchungen. Durch die Zellisolation kommt es hierbei nicht nur zu einer morphologischen Beeinträchti-

gung der Zellen, sondern auch zu einer eingreifenden Störung der in vivo begonnenen Steuerungsmechanismen einer synchronen Zellproliferation. Somit scheinen die Steuerungsmechanismen für den Beginn einer DNA-Synthese nach Proliferationsreiz, unabhängig welcher Natur diese sind, auch an das Vorhandensein einer weitgehend intakten Organstruktur gebunden zu sein, wie sie noch bei den Organperfusionen in vitro in der isolierten Leber gegeben ist.

Da aber Leberzellen nach Hepatektomie allein unter bestimmten Voraussetzungen in vitro eine begonnene DNA-Synthese fortsetzen können (26), bleibt als wichtiger Faktor die Einwirkung der HU-Behandlung auf die Zellen zu erörtern.

Die isolierte Leberzelle ist nach einer Zellisolation offensichtlich weniger gut in der Lage, die Folgen des durch Hydroxyharnstoff induzierten "unbalanced growth" auszugleichen, die ja in vivo gut ausgeglichen werden können.

Hierfür scheint wenigstens eine erhaltene Organstruktur notwendig zu sein. Gleichzeitig führt die Permeabilitätsstörung, die durch HU hervorgerufen wird (Adams 1972), in vitro zu einem irreversiblen Verlust wichtiger DNA-Vorstufen oder Beeinträchtigung von Steuerungsmechanismen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die durch Hepatektomie, HU-Infusion und Zellisolation vorbehandelten adulten Leberzellen eine DNA-Synthese in vitro nicht neu beginnen, aber auch eine in vivo begonnene Synthese in der Einzelsuspension nicht im gleichen Umfang wie in vivo fortsetzen können. Hierbei spielen neben den Kulturbedingungen Einflüsse durch die Zellisolation und die HU-Behandlung eine wesentliche Rolle.

4.4. Probleme der Impulscytophotometrie

Für die Diskussion der impulscytophotometrischen Versuche müssen vorweg folgende Punkte beachtet werden, da durch sie Ergebnisse generell beeinflußt werden können:

- Beeinflussung der DNA-Messung durch die vorbereitenden Zellpräparationsschritte.
- Besonderheiten, die sich aus der Wahl des Fluoreszenzfarbstoffes ergeben.
- Besonderheiten der hier angewandten Untersuchungsmethode.
- Geräte-spezifische Probleme, sowie Meßfehlerquellen im Gerät.

An ausgewählten Beispielen soll ihre Bedeutung verdeutlicht werden.

4.4.1. Präparation

Das oben beschriebene Verfahren zur Herstellung einer geeigneten Zellsuspension entspricht weitgehend der dem Gerät beigegebenen Vorschrift durch den Gerätehersteller (Firma Partec, Göttingen). Dieses Schema findet auch in der Literatur seine Anwendung (87, 88, 90, 105). Dabei ist die Notwendigkeit einzelner Präparationsschritte mit ihren etwaigen Auswirkungen auf die DNA-Struktur in der Diskussion, wie z. B. die Behandlung der Zellen mit Pepsin, hier könnten Änderungen in der DNA-Struktur und im DNA-Gehalt nicht sicher ausgeschlossen werden (90, 105). Für das hier verwandte System der Leberzellen nach Hepatektomie und ^{3}H-Infusion empfehlen sich nach den gemachten Beobachtungen aber folgende Grundsätze:

a) Die Behandlung der Zellsuspension mit RNAse ist zur Erhöhung der Fluoreszenzspezifität des Ethidiumbromides notwendig, da dieses auch mit noch vorhandener Zellkern-RNA eine fluoreszierende Verbindung eingeht (87, 107). Nach eigenen Beobachtungen ist das ausgewogene Verhältnis zwischen Zellzahl und Menge bzw. Aktivität an RNAse von entscheidender Bedeutung. Nur bei entsprechend niedriger Zellzahl von ca. 10^5 Zellen auf die angewendete Menge RNAse kann im Histogramm eine genügend scharfe Trennung der einzelnen Peaks erreicht werden. Bei ungenügender RNAse-Wirkung treten, wie aus Abbildung 26 er-

sichtlich, Veränderungen auf, die bei Nichtkenntnis der Umstände als Zellkern-eigene Veränderungen angesehen werden können.

b) Auf die Behandlung der Zellen mit Pepsin kann bei den hier verwendeten Zellen nicht verzichtet werden. Die Messung von Zellen ohne Vorbehandlung mit Pepsin in der angegebenen Weise ist bei einer Meßpore von 100 μ Durchmesser nicht möglich. Denn der Meßkanal war ständig verlegt, obwohl die Leberzellen schon nach Zellisolierung in guter Einzelsuspension vorliegen, durch kräftiges Schütteln während der Fixierung der Zellen in Methanol für eine gute Dispersion der Zellen gesorgt ist und diese noch zusätzlich unmittelbar vor der Messung durch ein Nylonsieb mit bekannter Porengröße (Durchmesser: 70 μ) filtiert werden. Die optische Kontrolle der mit Ethidiumbromid gefärbten Leberzellen ohne Pepsinbehandlung zeigt auch im Fluoreszenzmikroskop eine gut präparierte Einzelzellsuspension. Verantwortlich für den Umstand, daß eine Messung ohne Pepsinbehandlung nicht möglich ist, könnten daher zum einen doch die Größe der Leberzellen sein, die nach Hepatektomie und nachfolgender HU-Behandlung noch zunimmt (101), zum anderen eine erhöhte Aggregation und Adhäsion der Zellen untereinander im Moment des Durchflusses durch den Meßkanal.

c) Zellen ohne Vorbehandlung durch Pepsin zeigen nach der Färbung mit Ethidiumbromid im Fluoreszenzmikroskop eine relativ starke Fluoreszenz des Cytoplasmas (87, 108, 109), was ein weiterer Grund für die notwendige Behandlung der Zellsuspension mit Pepsin ist.
Andererseits ist als Folge der Pepsinierung der Zellen hervorzuheben, daß in den Histogrammen keine Aussage über das Verhalten der zweikernigen Leberzellen gemacht werden kann, die in den einzelnen Versuchen in dem oben angegebenen Prozentsatz vorhanden sind (Tab. 3). Diese zweikernigen Zellen verschwinden durch die Pepsinierung.

Da auch bei den Autoradiographien ihr Anteil an den markierten Zellen in allen Versuchen unter 10% liegt, bleiben sie bei der Beurteilung unberücksichtigt.

4.4.2. Ethidiumbromid als Fluoreszenzfarbstoff

Ethidiumbromid wurde 1969 von Dittrich und Göhde als Fluoreszenzfarbstoff bei der Durchflußphotometrie eingeführt. Seine DNA-Spezifität kann durch die Behandlung der Zellen mit RNAse und Pepsin erhöht werden (90, 87, 107). Die Gründe hierfür sind weiter oben bereits angeführt. Neben seiner hohen Spezifität muß Ethidiumbromid auch noch die Forderung nach strenger stöchiometrischer Bindung an den DNA-Komplex erfüllen. Die hier vorgelegten Ergebnisse der Impulscytophotometrie führen unter anderem auch zu der Frage, ob bei allen Versuchen, besonders bei denen nach längerer Verweildauer im Inkubationssystem, ein unterschiedliches Bindungsverhalten von Ethidiumbromid an die DNA eine Rolle spielen kann. Der Einfluß der vorbereitenden RNAse-Behandlung auf das Bindungsverhalten kann nach Durchsicht der Literatur (87, 90) sowie nach eigenen Beobachtungen als relativ gering angesehen werden. Dagegen wird aber durchaus ein unterschiedliches Bindungsverhalten des Farbstoffes an DNA unterschiedlicher Funktionszustände wie Eu- und Heterochromatin (90) oder an DNA in Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur (110) erörtert. Von den zellkinetischen Ergebnissen nach 2/3-Hepatektomie und 25-stündiger HU-Infusion ließe sich auch ein unterschiedliches Bindungsverhalten an DNA in der frühen oder späten S-Phase sowie ein Unterschied zwischen DNA in der Ruhephase und DNA bei Beginn der S-Phase nicht mit Sicherheit ausschließen (104).

Hinweise für die Beeinflussung der substratspezifischen und stöchiometrischen Bindungsfähigkeit von Ethidiumbromid an die Zellkern-DNA durch die Behandlung mitPepsin wurden nicht gefunden. Eine solche Beeinflussung kann aber nicht ausgeschlossen werden.

Auf diesem Gebiet sind weitere detaillierte Untersuchungen erforderlich, die jedoch den Rahmen der vorgelegten Arbeit übersteigen.

.4.3. Auswertung der Histogramme

Die hier angewendete Auswertungsmethode entstand aus dem Umstand, daß für die computergemäße Aufzeichnung der Ergebnisse sowie deren Verrechnung zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit keine Möglichkeit bestand. Bei zellkinetischen Untersuchungen kann durch Übereinanderlegen von zeitlich zusammenhängenden Histogrammen in erster Annäherung die Veränderung im DNA-Gehalt der inkubierten Zellen beurteilt werden. Dies ist auch möglich beim Vergleich einzelner Histogramme mit dem eines unbehandelten Tieres. Aus diesem Vergleich der Histogramme mit dem Standardhistogramm, bei dem Aussagen über Veränderungen der Peakhöhe sowie der Peakbreite gemacht werden können, entstand das hier angewandte Auswertungsmodell, durch Subtraktion des Standardhistogramms von den übrigen Histogrammen versuchsbedingte Veränderungen prozentual auszudrücken. Dieses Modell hat selbstverständlich eine größere Fehlerbreite als die Computermodelle. Das bedingt schon die mühsame Auszählung und Addition der einzelnen Kanalinhalte.
Ferner wird bei dem Modell davon ausgegangen, daß die Breite der 2c, 4c und 8c Peaks immer in allen Histogrammen gleich ist, unabhängig von der Höhe der Peaks. Somit muß ein überschneidender Anteil an S-Phasezellen der frühen bzw. späten S-Phase unberücksichtigt bleiben, der sicher die Randabschnitte der jeweils benachbarten 2c, 4c und 8c Peaks in ihrer Ausprägung beeinflußt, was durch andere Autoren mit Hilfe entsprechender mathematischer Modelle berücksichtigt wird (117). Dies ist immer dann der Fall, wenn die auszuwertenden Peaks niedriger und schmäler als die des Standardhistogramms sind. Damit im Zusammenhang könnte auch eine Beurteilung der aufgeteilten S-Phase-Kurven e1, e2 bzw. f1,

f2 stehen, die in ihrem zeitlichen Ablauf keinen sinnvollen Zusammenhang ergeben, wenn etwa nach Ende des HU-Blocks zuerst die Kurve der späten S-Phase-Zellen anzusteigen scheint.
Weiterhin unsicher bleibt die Auswertung der Anteile am Histogramm, die den Abschnitten um den 8c Peak mit später S-Phase vor und früher S-Phase nach diesem Peak angehören. Hier hilft die Überlagerung mit der Standardkurve, in der der Anteil der 8c Zellen gering ist, nur wenig weiter. Bei gründlicher Beobachtung der einzelnen Histogramme ergibt sich jedoch, daß der Anteil der S-Phase-Zellen nach 8c sehr gering ist, die zweite Hälfte dieses Peaks oberhalb des Mittelwertes von 8c (C - C2) zumindest im Histogramm fast ausschließlich von oktoploiden Zellen, welche nicht sythetisieren, gebildet wird. Daher wird bei der Auswertung dieses Peaks und des davor liegenden f2-Bereiches die oben beschriebene Auswertung gewählt (96).

4.4.4. Beeinflussung der Ergebnisse durch apparativ-technische Schwierigkeiten

Die apparativen Schwierigkeiten des hier verwendeten Gerätes beeinflussen die ermittelten Ergebnisse nicht unwesentlich. Ausdruck finden diese Probleme vorwiegend in besonderen präparativen Schritten zur Herstellung der gerätegeeigneten Zellsuspension. Die während der Versuche aufgetretenen Schwierigkeiten und die sich daraus ergebenden Konsequenzen sollen hier erörtert werden.

Wie schon im Abschnitt über die Zellpräparation erwähnt (4.4.1), stellt die besondere Art der Zellen, die in diesem Versuch verwendet wurden, besondere präparative Anforderungen. Gleichzeitig erweisen sich aber die dabei auftretenden Probleme als gute Kontrollmöglichkeit für die exakte Durchführung der Präparation. Die Enge der Meßpore (100 μ) zwingt im Falle der Leberzellen nach Hepatektomie und HU zu einer großen Verdünnung der Meßsuspension und einer daraus

resultierenden Impulsrate von ca. 0,1, d.h. nur etwa 100 Zellen gelangen pro Sekunde durch die Meßpore (113, 88)). Diese liegt somit weit unter den in der Literatur angegebenen Werten von 500 Zellen pro Sekunde. Bei den Zellproben nach längerer Inkubation ist sogar noch eine weitere Senkung der Pulsrate nötig, um überhaupt brauchbare Meßergebnisse erzielen zu können. Dennoch dürfte es auch bei sorgfältigstem Arbeiten unmöglich sein, Aggregationen von Bestandteilen der Suspension zu verhindern. Damit ergibt sich aber gleich die Frage nach der Häufigkeit der dabei auftretenden Koinzidenzen während der Fluoreszenzmessung und wieweit dadurch die Ergebnisse verfälscht werden. Die Aggregation zweier oder mehrerer Zellkerne kann als Ursache für Koinzidenzen beim Einhalten der angegebenen Verdünnung der Zellsuspension als relativ gering angesehen werden. Denn eine eindeutige "6c-Peak"-Aggregation einer 4c und 2c Zelle oder drei 2c Zellen tritt nicht auf. Dagegen muß auf Grund der erzielten Ergebnisse auch eine Aggregation von Kernbruchstücken untereinander sowie mit einzelnen noch intakten Kernen angenommen werden. Diese Kernbruchstücke und ihr vermerhtes Auftreten nach längerer Inkubation lassen sich bei der Kontrolle der Suspension als kleine isoliert liegende Einzelbruchstücke im Fluoreszenzmikroskop nachweisen. Ähnlich wie bei der Aggregation der Zellkerne selbst ist es vorstellbar, daß erst während des Meßvorganges selbst im Flüssigkeitsstrom eine Aggregation mehrerer Teile zustande kommt, was sich dann einer Beurteilung entzieht. Eine kurzfristige Behandlung der Zellproben mit Ultraschall, wie sie zur Trennung der einzelnen Teilchen und zur Abtrennung des Zellschutts empfohlen wird (115, 116), bringt nicht den erhofften Erfolg.

Bei synchronisierten Zellen ist nach Beendigung der Synchronisation mit zunehmendem Abstand zum Block-Ende eine Verschiebung des euploiden Zellpeaks durch den S-Phase-Bereich zu erwarten. Dies ist auch wiederholt nachgewiesen worden (96, 117, 120). Auch bei den hier erstellten Histogrammen

ist zumindest in Ansatzpunkten eine Verschiebung des Hauptpeaks - meistens des 2c Peak - auf der Abszisse nach rechts zu erkennen. Grundsätzlich ist nun diese Vermehrung der Fluoreszenzsignale im S-Phase-Bereich auf zwei Arten zu erklären:

1. Es kann sich um eine tatsächliche Vermehrung der Fluoreszenz des Zellkern handeln, was als Zunahme an DNA im Zellkern gedeutet werden müßte. Es würde sich somit um S-Phase-Zellen handeln.
2. Daneben kann aber auch eine zunehmende Helligkeitsentwicklung im Meßfeld für eine beginnende Verschiebung der Kurve auf der Abszisse nach rechts verantwortlich sein.
   Denn bei der hier verwendeten Serat 100 W und dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid bestimmt nicht nur die Fluoreszenz der Zelle, sondern auch die relative Helligkeit des Meßfeldes die absolute Höhe des Signals (94).

Während der Meßvorgänge konnte eine Verschiebung der Histogramme beobachtet werden, für die es in den vielen Fällen keine geeignete Erklärung gab. Auch bei wiederholten Eichungen mit dem Hühnererythrozytenstandard war diese Verschiebung auf der Abszisse nach rechts zu beobachten. Als Beispiel sei das Histogramm von Leberzellen nach 14-stündiger HU-Infusion, die 14 Stunden nach Hepatektomie begonnen wurde, erläutert. Nach 14-stündiger HU-Infusion bis zur 28. Stunde nach Hepatektomie ist unmittelbar nach HU-Infusionsende noch kein wesentlicher Anstieg der DNA-Syntheserate der Leberzellen zu erwarten (80). Bei der Auswertung dieses Histogrammes, kann dieses Ergebnis bestätigt werden, wenn unter Kenntnis der autoradiographischen Ergebnisse (Seiler) die Auswertung folgendermaßen vorgenommen wird: tatsächliche Peakmitte der diploiden Zellen (2c Peak) bei Kanal 27, der tetraploiden Zellen (4c Peak) bei Kanal 52 und der oktoploiden Zellen (8c Peak) bei Kanal 104. Dabei werden folgende Werte ermittelt: 2c = 50,5%, 4c = 33,2%, 8c = 1,1%,

Kalkgehalte (C) = 2,21%, S = 2,83%, P = 2,14%, Rest über Si = 1,24%.

Bei entsäuerter Kupolofenschlacke wurde eine basische Probe, die aus einem Ofen, der mit Koks und Kalkstein betrieben wurde, stammte, untersucht. Sie ließ auf die entsprechenden Werte schließen, wobei in Übereinstimmung mit S-Gehalt der Probe folgende Werte ermittelt: Ca = 26,33%, Mg = 11,81%, Si = 1,51%, S = 1,39%, P = 24,25%, P = 2,83%, Rest über Si = 1,21%.

Die Analyse teilt auf, daß sich die Unterschiede nur auf die Gehalte der Ca und Mg Zellen und der dazugehörigen S-Maßstabmarken beziehen, daß die Werte der S-Skalenbereiche Zeichen Mg und Si weitgehend bei beiden Methoden übliche.

Wenn vorteilhaft wird die Meßgenauigkeit bei der Abstimmung, bei denen nur der qualitative Nachweis des Vorhandenseins eines Bestandteiles von Interesse ist, hier ist man großen Unterschied auf die Genauigkeit, da sie bereits wenige % des Gesamtgehaltes betragen, noch möglich.

Als Ursache für diese Meßfehlerquelle kommen folgende Umstände angesehen werden: Verunreinigungen der Meßkurve, die sich gelegt hat dem Film verdeckten Bereich mit starker Meßkurve besonders häufig aufgetreten sind, wenn das sie in der Meßkurve stärker gewesen wären, kommen zu einer Helligkeitsvarianz des Meßfeldes führen (S3). Chemische Veränderungen des Emulsionsfilms unter dem Langzeiteinfluß und Unterschied Einfluß des Lichtes mit einer Wellenlänge von 5% nm kommen nicht ausgeschlossen werden, wegen dieser Erscheinung sowie bei unterschiedlicher Energien als auch unterschiedlicher Einwirkungsdauer des Lichtes auf das Si gleich auf'zet.

Im vorliegenden Fall kann als wahrscheinlichste Ursache das

schon weiter oben erwähnte Auftreten von kleinsten Luftblasen an der Grenzschicht zwischen Immersionsöl und Objektiv angenommen werden. Wenn es gelingt, diese Luftblasen, die durch eine Lupe zu erkennen waren, zu entfernen, können die oben beschriebenen Verschiebungen der Histogramme wieder rückgängig gemacht werden.

4.5. Erörterung der Leberzellhistogramme

Die dargestellten ICP-Ergebnisse von Leberzellen unbehandelter oder nur hepatektomierter Tiere mit zunehmendem Abstand des Isolationszeitpunktes vom Zeitpunkt der Hepatektomie stellen die Beurteilungsgrundlage für die Histogramme der Versuchsgruppen mit Leberzellen nach HU-Behandlung dar. Diese Ergebnisse werden verglichen mit solchen, welche ausschließlich in statischen DNA-Bestimmungsverfahren gewonnen wurden. Grundsätzlich haben die Ergebnisse der Durchfluß-cytophotometrie auf Grund der deutlich höheren Zahl an gemessenen Zellen den Vorzug der größeren statistischen Wahrscheinlichkeit.
Die als Standard bezeichneten Histogramme (Abb. 12, 14) von unbehandelten Tieren können von den technischen Voraussetzungen her als optimal bezeichnet werden. Sie werden aus zahlreichen Messungen ausgewählt. Dabei waren der symmetrische Aufbau der Peaks, deren scharfe Trennung untereinander und die dabei notwendige minimale Countzahl die Auswahlkriterien. Diese Histogramme erlauben somit eine repräsentative Aussage über die Verteilung der DNA-Klassen in der ruhenden Leber eines erwachsenen Tieres. Zusammen mit der Prozentzahl an zweikernigen Zellen bestätigen sie damit die schon früher erhobenen Ergebnisse (121; ca. 25% zweikernige Zellen insgesamt) oder präzisieren die Angaben über die DNA-Klassen, wonach in der ruhenden Leber 25% aller Zellkerne den diploiden Zellen, 70% den tetraploiden und der Rest den Oktoploiden und denen mit höherem DNA-Gehalt zuzurechnen sind (102).

Bei gutem Auflösungsvermögen des Gerätes kann weiter gezeigt

werden, daß in der Leber von jugendlich-adulten Ratten der Anteil der Zellen mit einem DNA-Gehalt über 8c nicht mehr meßbar ist. Auch das Überwiegen von tetraploiden Zellkernen als "Regelklasse" mit zunehmendem Alter (102) kann in den Histogrammen nachgewiesen werden, auch wenn der Gesamtprozentsatz der tetraploiden Zellen in den vorgelegten Ergebnissen niedriger ausfällt als bisher in der Literatur angenommen (ca. 67% gegen fast 80% bei Nadal und Zajdela).

Die angegebenen Prozentwerte über dem S-Phase-Bereich in der ruhenden Leber, der besonders zwischen 4c und 8c deutlich über dem Bereich zwischen 2c und 4c liegt, müssen unter dem Gesichtspunkt der Verunreinigung der Zellsuspension (Zelldetritus) sowie als Ausdruck der Streuung gewertet werden, die dem Gerät von vornherein zu eigen ist. Während der kaum meßbare Wert des Markierungsindex in vivo (121, 131) seinen Ausdruck in dem niedrigen Wert der S-Phase zwischen 2c und 4c zeigt (0,8 bzw. 3%), zeigt sich das Ausmaß der Gerätestreuung in dem höheren Wert von f ("S-Phase" zwischen 4c und 8c).

Insgesamt kann somit den Histogrammen von Leberzellen unbehandelter Tiere eine große Wertigkeit zugemessen werden.

Die für die Beurteilung der Leberzellen nur nach Hepatektomie oder nach Hepatektomie und HU-Behandlung wichtigen Histogrammergebnissen sollen noch einmal zusammenfassend dargestellt werden (Abb. 27). Im Vergleich mit den Histogrammen von Tieren mit zunehmenden Abständen nach Hepatektomie (Abb. 15) führt die Behandlung mit HU über 25 Stunden beim hepatektomierten Tier zu einer deutlichen Verminderung der 4c Zellen und zu einer geringeren Abnahme auch der 8c Zellen. Der Anteil der 2c Zellen erreicht annähernd wieder Werte wie beim unbehandelten Tier, nachdem unmittelbar nach Hepatektomie allein zunächst eine Reduzierung des 2c Anteils zu sehen ist. Es finden aber offensichtlich schon Veränderungen im S-Phase-Bereich in der Zeitspanne nach Hepatektomie bis zum Einsetzen der DNA-Phase (Abb. 27) statt.

Dabei kommt es schon neben einer Verminderung der einzelnen DNA-Klassen in der 3. Stunde nach Hepatektomie zu einer Zunahme der S-Phase-Zellen, die der "endomitotischen Poliploidisierung" (99) zwischen der 4. bis 9. Stunde nach Hepatektomie entsprechen könnte. Neben der oben erwähnten Möglichkeit der gerätebedingten Fehlmessung muß auch bei den Histogrammen 3 und 12 Stunden nach Hepatektomie eine präproliferative DNA-Synthese angenommen werden, die auch als DNA-Synthese im Sinne des physiologischen Ersatzwachstums des verbliebenen Restgewebes nach Hepatektomie gedeutet werden könnte. Es könnte sich hier ebenso um Veränderungen in der DNA-Struktur im Verlauf der G_1-Phase und am Übergang G_1 - S-Phase handeln, die durch eine andersartige Ethidiumbromid-Bindung zum Ausdruck kommen. Gleichzeitig finden nach einer 2/3-Hepatektomie Veränderungen in der Rate der zweikernigen Zellen sowie im Zellvolumen statt (101, 102). Auch in den Versuchen unmittelbar nach Hepatektomie können solche Veränderungen in der Rate der zweikernigen Zellen gefunden werden (Tab. 3). Zusammen mit diesen Veränderungen sowie den Kernvolumenänderungen (101) kann auch eine Veränderung in der Dichte der Kern-DNA nicht ausgeschlossen werden und somit auch ein verändertes Färbeverhalten, wie es auch für unterschiedlich strukturierte DNA einer Zelle nachgewiesen ist (110).

Dabei muß zunächst unklar bleiben, ob es sich bei diesen angenommenen Veränderungen um tatsächliche Vorbereitungsschritte für die neue DNA-Phase oder um Zeichen einer geschädigten Zellfunktion bzw. -morphologie handelt. Bei der Auswertung der entscheidenden Histogramme (3 und 12 Stunden nach Hepatektomie), die sich nicht an die Art der "Standardmodellauswertung" hält, sondern eine Auswertung entsprechend der tatsächlichen Lage der einzelnen Peaks auf der Abszisse vorsieht, bestätigt sich, daß mindestens bis zur 12. Stunde nach Hepatektomie keine wesentliche DNA-Synthese stattfindet (Tab. 7b). Die dabei gefundenen Werte (ca. 2%) liegen noch im Gerätefehler-Bereich. Neben dieser

fast nicht meßbaren S-Phase bleiben zugleich die Werte für die einzelnen Ploidiestufen im Vergleich zum nicht behandelten Tier nahezu unverändert. Veränderungen in der Kern-DNA-Dichte der Struktur, am Übergang von G_1 zur S-Phase mit entsprechendem Bindungsverhalten bei der Ethidiumbromid-Färbung können nicht völlig ausgeschlossen werden. Bei einer Wertung muß natürlich den Ergebnissen, die ohne Anwendung der Standardauswertung erhoben wurden (Tab. 7b), der Vorzug gegeben werden, da sie auch in der Literatur vielfach bestätigt sind. Es werden somit die erwähnten Schwierigkeiten der Auswertung sichtbar, die ohne sicheren Anhalt durch andere Untersuchungsmethoden (z.B. Autoradiographie oder Scintillationsmessung) die Aussagekraft der hier angewandten ICP-Methode unsicher macht.

Das Histogramm der Leberzellen zum Zeitpunkt der maximalen DNA-Synthese 24 Stunden nach Hepatektomie stellt fast genau den gleichen Anteil an S-Phase-Zellen dar, wie durch Autoradiographie von anderen Autoren gefunden wurde (28, 27, 31). Es unterscheidet sich aber wesentlich von der stationären DNA-Messung durch Grundmann und Bach, wo eine beinahe völlige Reduktion der 2c Zellen und ein deutliches Überwiegen der 4c Zellen zur Darstellung kommt (102). Schon eher scheint eine gleichmäßige Verteilung der Zellen der einzelnen Ploidiestufen bei Eintritt in die S-Phase vorzuliegen, wie auch die dicht beieinander liegenden Werte für die einzelnen Abschnitte der S-Phase (e, f) annehmen lassen.

Wesentlich höher ist auch der Anteil schon synthetisierender Zellen im ICP-Histogramm zur 14. Stunde nach Hepatektomie als bisher in der Literatur angegeben. Nach Stöcker findet in dieser Phase erst die Umschaltung vom langsamen zum schnellen Proliferationsverhalten der Zellen statt (99). Nach den ICP-Ergebnissen müssen ein Großteil der Zellen bereits in dieser Phase eine hohe Syntheseaktivität erreicht haben, oder zumindest unmittelbar am Übergang von G_1 zur S-Phase stehen.

Der Vollständigkeit halber sind auch die ICP-Ergebnisse 48 und 72 Stunden nach Hepatektomie zu erwähnen. Hier ist anzumerken, daß die Synchronie der Leberzellen reduziert ist und die Zellen mit der kürzesten Zellzykluszeit bereits erneut in eine zweite S-Phase eintreten können (100). Ein wesentlicher Unterschied in den Ergebnissen der ICP-Histogramme zu den bisherigen Ergebnissen ist darin zu suchen, daß die für die ICP-Messung verwendeten isolierten Leberzellen einen allgemeinen Durchschnitt der gesamten Leberzellpopulation darstellen und intralobuläre Verteilungsmuster (28, 31, 97, 100) hier nicht erfaßt werden.

Immerhin sind bei kontinuierlicher 3H-TdR-Infusion bis zur 40. Stunde nach Hepatektomie (100) über 60% der gesamten Hepatozytenpopulation markiert, während bei der Pulsmarkierung der Markierungsindex 30% nicht übersteigt.

Tabelle 7: Ergebnisse der Histogrammauswertung von Leberzellen, die 3 bzw. 10 Stunden nach 2/3-Hepatektomie isoliert wurden.

7a	2c	4c	8c	S-Phase
Standard-auswertung				
Unbehandelte Tiere	35,28	55,77	4,96	3,83
3 Std.nach Hepatektomie	34,24	49,79	1,84	14,8
12 Std. nach Hepatektomie	22,31	41,92	3,1	32,60
7b				
Individuelle Auswertung				
3 Std. nach Hepatektomie	39,69	54,81	3,00	2,39
12 Std.nach Hepatektomie	36,79	58,06	2,92	2,20

7a: Auswertung der Histogramme nach der beschriebenen Standardauswertungsmethode,
Peakmitte: 2c = Kanal 25, 4c = Kanal 50, 8c = Kanal 100

7b: Auswertung der Histogramme entsprechend der tatsächlichen Peakmitte auf der Abszisse
3 Std. nach Hep.: 2c = 26, 4c = 51, 8c = 99
12 Std. nach Hep.: 2c = 27, 4c = 53, 8c = 105

4.5.1. Inkubation von Leberzellen 14 Stunden nach Hepatektomie über 7 Stunden

Am Beispiel isolierter Leberzellen 14 Stunden nach Hepatektomie, die anschließend für 7 Stunden inkubiert wurden, wird die Verlagerung von den bisher erwähnten technischen und interpretatorischen Problemen hin zu den biologischen Schwierigkeiten der gestellten Aufgabe deutlich. Es sei auch hier auf den erheblichen Unterschied zu den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen der Autoradiographie und Scintillationsmessung hingewiesen, die bei diesen Zellen einen minimalen 3H-TdR-Einbau zeigen. Bei isolierter Betrachtung der Histogramme ist unmittelbar nach der Zellisolation bis zur 7. Stunde der Inkubation eine Zunahme von DNA-synthetisierenden Zellen um 35% anzunehmen, sodaß bei einem Ausgangswert von 20% zum Zeitpunkt der Isolation sich etwa 55% aller Zellen zur 20,5. Stunde nach Hepatektomie in der DNA-Synthese-Phase befinden. Dieser Wert ginge weit über die Werte der Wachstumsfraktionsbestimmung in vivo durch RABES et al (100) hinaus. Weiter widerspricht dieses Ergebnis, wie schon oben erwähnt, bisherigen in vitro-Versuchen mit proliferierenden Leberzellen (26), bei denen keine DNA-Synthese stattfindet, wenn die Zellen zwischen 14 und 16 Stunden nach der Hepatektomie isoliert werden.

Bei kritischer Betrachtung der Histogramme muß vielmehr festgestellt werden, daß eine effektive DNA-Synthese im Verlauf der Zellinkubation nicht stattfindet. Die in der Abbildung 17a dargestellte Zunahme im S-Phase-Bereich beruht, wie aus der zunächst isolierten Zunahme der Kurve e2 (Abb. 17b) hervorgeht, auf einer Zunahme der Peakbreite des 4c Peaks nach links auf der Abszisse, und nicht nach rechts, wie eigentlich zu erwarten wäre. Auch die deutliche Abnahme der tetraploiden Zellen führt nicht zu einer Zunahme des darauf folgenden S-Phase-Bereichs (Abb. 17b). Schon nach der 2. Versuchsstunde ist eine ähnliche Verschiebung nach links auch beim 2c Peak zu beobachten. Das schon oben er-

wähnte "Herauswachsen des Zelldetritus" aus dem 2c Peak findet durch den Zelluntergang und das Zerbrechen der Zellkerne seine Erklärung. Diese Zunahme des Zelldetritus reicht über die gesamte Abszisse des Histogramms und führt zur unimodalen Histogrammverteilung, die für Detritus ein typisches und oft dargestelltes Beispiel ist (106, 87, 116, 119).
Hieraus ist der Schluß zu ziehen, daß in dem hier angewendetenModell nach alleiniger Hepatektomie die Zellen zu einer DNA-Synthese wie in vivo nicht mehr fähig sind (26, 34), vielmehr findet ein ganz erheblicher Zellzerfall in vitro statt, der in der Zerfallshyperbel seinen Ausdruck findet.

4.5.2. ICP-Histogramme von Leberzellen nach Hepatektomie und HU-Infusion

Zwischen der 40. und 43. Stunde nach Hepatektomie, nach Beendigung einer 25-stündigen HU-Infusion kommt es in vivo zu einer maximalen Zunahme der DNA-synthetisierenden Leberzellen (95). Zwischen 70 und 80% der gesamten Parenchymzellen befinden sich in der S-Phase. Prinzipiell stellt damit auch dieses Modell ein geeignetes Untersuchungsmaterial für die Durchflußzytophotometrie dar. Mit den von RABES und Mitarbeitern an dem in vivo-Modell ermittelten Zellzykluszeiten ließen sich sicherlich mit Hilfe geeigneter Computermodelle theoretische Histogramme nachbilden, die denen anderer synchronisierter Zellen nahekommen (114, 121). Bei der praktischen Durchführung der in vitro-Versuche können diese Erwartungen nicht erfüllt werden, wie die dargestellten Ergebnisse klar erkennen lassen. Dabei mögen zwei Probleme eine Rolle gespielt haben:

1. Es muß diskutiert werden, in wie weit die Abweichung dieser Ergebnisse von den in vivo-Ergebnissen durch methodische Fehler verursacht wurden. Schwerpunktmäßig soll hier das Inkubationssystem in Verbindung mit den Kulturbedingungen für die Leberzellen genannt werden. Dabei

mußte auf in dieser Arbeitsgruppe bewährte Kulturbedingungen zurückgegriffen werden, die sich an juvenilen Leberzellen gut bewährt hatten (12). Es hätte den Rahmen dieser Untersuchungen gesprengt, wenn auch hier über das an anderer Stelle dargestellte Maß hinaus Modifikationen und Versuche zu diesem Problemkreis durchgeführt worden wären (s. Arbeit von G. Manolikakis).

2. Speziell die Histogramme der Leberzellen unmittelbar nach Isolation (Abb. 18a, 18b) zeigen, daß über die technischen und methodischen Schwierigkeiten der Versuche auch Leberzell-spezifische Faktoren hier eine wesentliche Rolle spielen.

4.5.3. Histogramme der Leberzellen unmittelbar nach Isolation

Die graphische Darstellung dieser Histogramme (Abb. 18a, 18b) macht deutlich, daß nicht nur weniger Zellen in die S-Phase eintreten, sondern daß auch die S-Phase weniger synchron von den DNA-synthetisierenden Zellen durchlaufen wird. Nur zwischen 40 und 50% aller Zellen befinden sich im Zeitraum 3 - 4 Stunden nach HU-Ende in der S-Phase, bei dem in vivo nahezu 80% der Zellen in DNA-Synthese sind. Die Darstellung des S-Phase-Bereichs jeweils zwischen 2c und 4c bzw. 4c und 8c (e, f) läßt einen zeitlich unterschiedlichen Verlauf dieser Kurven erkennen, der nach den in vivo-Ergebnissen aber zeitgleich verlaufen müßte. In vivo scheint die DNA-Synthese von dem Ploidiegehalt der Zellen unabhängig zu sein (31, 100).

Bei sonst gleicher Ausgangslage zu den in vivo-Ergebnissen muß offensichtlich der Zellisolation eine große Bedeutung für das Abweichen der Resultatezukommen. Daß eine DNA-Synthese begonnen wird, wenn auch in deutlich geringerem Ausmaß, belegen die Autoradiographieergebnisse, die über 7 Stunden in vitro markierte Zellen zeigen, während der Zellpräparation laufen aber offensichtlich Vorgänge an den Zellen ab, die bewirken, daß eben ein erheblicher Teil der Zellen in den Histogrammen mit aneuploidem DNA-Gehalt zur

Darstellung kommt, also fälschlich in den Abschnitten des Histogramms liegen, die DNA-synthetisierenden Zellen entsprechen. Das bedeutet zunächst nicht, daß sich die in vivo-Ergebnisse (ab der 3. Stunde nach HU 80% der Zellen markiert) und die in vitro-Ergebnisse der Impulscytophotometrie (55% der Zellen in der 3. Stunde nach HU mit einem DNA-Gehalt eindeutig im Zwischenbereich zwischen den euploiden Zellen) gegenseitig ausschließen müssen. Bei den in vivo-Ergebnissen (95) sagt zunächst der hohe Markierungsindex nichts über den Gehalt an DNA in den Zellkernen aus. Die Steilheit des Anstiegs der Markierungsdichte kann auch durch die spezifische Aktivität des DNA-Vorläuferpools verursacht werden, sodaß es erst allmählich zu einer impulscytophotometrisch meßbaren Zunahme an DNA im Zellkern kommt.

Wenn es in diesen Histogrammen nie zu einem Anstieg des S-Phaseanteils auf in vivo vergleichbare Werte kommt,so kann diese Diskrepanz auch auf eine verminderte Resistenz der DNA-synthetisierenden Zellen während der Zellisolation zurückgeführt werden. Diese erhöhte Empfindlichkeit der vorbehandelten Leberzellen scheint als Erklärung der Ergebnisse sowohl der Impulscytophotometrie als auch der Autoradiographie und Scintillationsmessung nach wenigen Stunden der Zellinkubation naheliegend. Wie auf Grund des Kurvenverlaufs in Abb. 18a angenommen werden kann, scheint die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber der Isolation während der S-Phase zuzunehmen. Ein Plateau der S-Phasekurve wie in vivo zwischen der 3. und 5. Stunde besteht in vitro nicht. Ohne Berücksichtigung der oben erwähnten Schwierigkeiten der Histogramminterpretation und -auswertung ergibt sich bei den Histogrammen von Leberzellen unmittelbar nach Isolation folgender Unterschied zu den in vivo-Ergebnissen: Der niedrigere Prozentsatz an Zellen in der S-Phase beruht auf einer deutlichen und schnellen Zunahme der Zellen mit oktoploidem DNA-Gehalt (8c) bereits in der 2. und 3. Stunde nach HU-Infusionsende. Abb. 18a zeigt,

daß vor allem die tetraploiden Zellen schnell die S-Phase durchlaufen und damit auch zu einer Zunahme der Zellen mit oktoploidem DNA-Gehalt (4c Zellen in der G_2-Phase) führen. Hingegen durchlaufen die 2c Zellen langsamer und weniger geordnet die S-Phase, ein ähnlicher logischer Kurvenverlauf wie bei den tetraploiden Zellen ist für diese Zellen nicht zu sehen (Abb. 18b, Kurve e, e1, e2). Eine bevorzugte Schädigung der 2c Zellen durch die Zellisolation kann dadurch ausgeschlossen werden, daß der Zellschuttanteil in den einzelnen Histogrammen von Leberzellen unmittelbar nach Isolation nicht wesentlich differiert. Das bedeutet, daß die Leberzellen nach Hepatektomie und HU-Infusion weniger synchron als bisher angenommen entsprechend ihren Ploidiestufen die DNA-Synthese durchlaufen. Dies widerspricht aber in vivo Untersuchungen, wonach die Dauer der Synthese-Phase unabhängig vom Ploidiegrad ist (100). Ebenso liegen die tetraploiden Zellen in vivo eher im perivenösen Teil des Leberläppchens (31, 100), wo zumindest nach Hepatektomie der Beginn der DNA-Synthese verzögert anläuft.

4.5.4. Histogramme inkubierter Leberzellen

Die Histogramme von Leberzellen während der Inkubation stimmen weder mit den in vivo-Ergebnissen noch mit den hier erzielten Ergebnissen der Autoradiographie und Scintillationsmessung überein. Der, wenn auch geringe, Anteil der Zellen, die in den Autoradiographien auch während der Inkubation in die S-Phase eintreten, kommt in den Histogrammen nicht zum Ausdruck. Ein den in vivo-Ergebnissen oder der Abb. 18a/b entsprechender Kurvenverlauf kann nicht nachgewiesen werden.

Der ständig ansteigende Verlauf der S-Phase-Kurve in beinahe allen Versuchen gleicht dem parallel verlaufenden Anstieg der Zelltrümmer (d) über die Zeitdauer des Versuches.

Der in nahezu allen Kurvenabbildungen feststellbare Anstieg der S-Phase läßt zunächst an ein "Anlaufen" der Zellen in der S-Phase bis zu einem bestimmten Punkt denken, ohne daß die S-Phase entgegen den in vivo Ergebnissen unter den in vitro-Bedingungen deutlich verlangsamt ist (95, 100).
Dies stünde dann aber im Gegensatz zur deutlich kürzeren S-Phase der Leberzellen nach Proliferationsreiz (31, 95, 100) und HU-Behandlung. Dabei muß der Zeitspanne der Zellisolation, d.h. der Zeit zwischen Beginn der Leberperfusion und Entnahme der ersten Meßprobe, ein entscheidender Teil an der Störung sowohl der die DNA-Synthese vorbereitenden Schritte wie auch der Weiterführung der Synthese zugesprochen werden. Offensichtlich sind für den Beginn der DNA-Synthese nach Hepatektomie und HU ebenso wie nach Hepatektomie Bedingungen nötig, die unbedingt an einen intakten Organismus oder zumindest eine unversehrte Organstruktur gebunden sind. Dies wird auch aus Versuchen der Parabiose mit Austauschtransfusion oder Veränderungen in der Blutversorgung der Leber erkennbar, wo einerseits die Notwendigkeit humoraler Faktoren, andererseits auch weitgehend intakte Organverhältnisse für den Beginn der DNA-Synthese nach Proliferationsreiz gefordert werden (Übersicht bei Grundmann 102, 34).

Bei kritischer Durchsicht der Histogramme während der Zellinkubation müssen die bisherigen Aussagen noch weiter eingeschränkt werden. Das Ausmaß der in vitro noch stattfindenden DNA-Synthese muß entsprechend den Autoradiographieergebnissen so gering sein, daß sie in den Histogrammen nicht mehr zur Darstellung kommt. Der zu verzeichnende Anstieg der S-Phase-Kurve kommt vielmehr durch folgendes Phänomen zustande:
Anders als bei anderen synchronen Zellsystemen (114, 117, 120) zeigen die Histogramme nicht jene Zunahme der Zellen im S-Phase-Bereich beginnend bei niedriger Ploidiestufe (2c, 4c) hin zu höheren Ploidiestufen (4c. 8c), vielmehr

beginnt die "Auffüllung" des S-Phasetals vorwiegend an der linken Flanke der einzelnen Peaks. Das bedeutet, daß es nach den Histogrammen zuerst zu einem Anstieg des späten S-Phase-Anteils (e2) käme. Dies zeigt sich bei fast allen Versuchen in dem der S-Phase zugeordneten Anteil zwischen 2c und 4c.
Nach dem bisherigen Verständnis der ICP-Ergebnisse bedeutet dies, daß die Zellen im Verlauf der Inkubation nicht nur funktionsuntüchtig werden, sondern daß auch weitgehend Kernbruchstücke entstehen, daß also ein Verlust an DNA auftritt. Die unmittelbare Präparation der Zellkerne mit RNAse und Pepsin scheint keine direkte Rolle zu spielen. Es muß bereits zu Beginn der Zellinkubation die Zellschädigung so groß sein, daß entweder DNA verloren geht, oder durch Strukturveränderungen eine verminderte Anfärbbarkeit der DNA mit zunehmender Dauer der Zellisolation entsteht.

Bei allen Histogrammen bleibt auffällig, daß sich der 2c Peak immer relativ scharf und gut abgegrenzt um seinen Mittelwert (Kanal 25) darstellt, auch wenn bereits der 4c und 8c Peak in einer zunehmend einseitig-schief werdenden Verteilung unscharf geworden sind. Das würde bedeuten, daß der Anteil der diploiden Zellen länger eine homogene Integrität bewahrt und vergleichbare Verluste an DNA wie bei den 4c und 8c Zellen während der Inkubation nicht eintreten. Im Zusammenhang mit den Histogrammen nicht inkubierter Leberzellen (Abb. 18a/b) scheint damit eine größere Empfindlichkeit derjenigen Zellen gegenüber Manipulationen und Milieuveränderungen gegeben zu sein, die sich während der Isolation oder kurz danach schon in der S-Phase befinden, d.h. vorwiegend tetraploide Zellen, während die Zellen, die erst verzögert DNA synthetisieren, in vitro auch länger ihre Integrität bewahren. Eine Bestätigung findet diese Annahme in den Histogrammen von denjenigen Leberzellen HU-behandelter Ratten, die erst zu einem Zeitpunkt isoliert wurden, zu dem nach den Ergebnissen in vivo eine deutliche Abnahme der DNA-Synthese zu verzeichnen ist. Bei diesen

Versuchen, bei denen Zellen zwischen der 6. und der 9. Stunde nach HU-Infusionsende isoliert wurden (78-40, 50, 60) , sind zwar auch die Inkubationsauswirkungen eindeutig sichtbar, die Histogramme sind in ihren einzelnen Peaks aber deutlich besser differenzierbar: Bis zur 5. Versuchsstunde sind die Ploidiestufen 2c, 4c und 8c gut zu trennen. Das bedeutet, daß kein so ausgeprägter Zellverfall wie bei den Versuchen mit früheren Inkubationszeiten nach HU-Infusion, d.h. in frühen Stadien der DNA-Synthese stattfindet, was auch in einer geringeren Zunahme des Zelldetritus bei diesen Versuchen (Abb. 19) zum Ausdruck kommt.

4.6. Vergleich der Untersuchungsmethoden Autoradiographie und Impulscytophotometrie

Daß beide Untersuchungsmethoden nicht unmittelbar verglichen werden können, ist verschiedentlich angeführt worden (111). Dennoch wird die Methode der Autoradiographie zur Kontrolle der relativ neuen Methode der Impulscytophotometrie von vielen Autoren durchgeführt (117, 119). Auch in der vorliegenden Arbeit liefern beide Methoden wertvolle, sich ergänzende Aussagen über ein und dasselbe Untersuchungsobjekt.
Nach den Autoradiographien ist nur ein kleiner Anteil von Zellen in der Lage, DNA auch über mehrere Stunden unter Kulturbedingungen zu synthetisieren. Nach den Histogrammen ergibt sich, daß der größte Teil der Zellen, die in vivo bereits mit der DNA-Synthese begonnen haben, diese in vitro nicht fortsetzt, sondern eine große Zahl DNA-synthetisierender Zellen während der Inkubation in Kernbruchstücke zerfallen. In diesem Zusammenhang ist nicht klar, welche Bedeutung die hohe Zahl markierter Zellen in den Autoradiographien bei dem starken Zelluntergang in den Histogrammen haben.

Der steile Anstieg des Zelldetritusanteils am gesamten

Histogramm überdeckt zum einen den Anteil dieser necrotischen am Histogramm und läßt somit nicht erkennen, ob diese Zellfraktion gegenüber den Einflüssen der Zellisolation weniger empfindlich ist. Andererseits könnte angenommen werden, daß DNA-Synthesefähigkeit von isolierten Leberzellen eine Zellintegrität nicht voraussetzt. Kurzzeitige hohe Aufnahme von ^{3}H-Thymidin in den Zellkern ist nicht gleichbedeutend mit einem Ausmaß an DNA-Synthese, die im Histogramm sichtbar wird.

Aus den Erfahrungen, die bei der Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit gewonnen werden konnten, muß festgestellt werden, daß beim verwendeten Detergens TCA II auf die Kombination beider Untersuchungsmethoden gerade bei Leberzellen nicht verzichtet werden kann, um Fehlinterpretationen zu vermeiden.

4.7. In vivo applizierter Hydroxyharnstoff und seine Wirkung auf Leberzellen in vitro

In Anbetracht der bisher angeführten Schwierigkeiten des Versuchsaufbaues, der Methodik und der Auswertung erscheinen Aussagen über die HU-Wirkung auf die Leberzellen problematisch. Die naheliegende Überlegung, daß HU eine besonders schädigende Wirkung auf die Leberzellen nach der Zellisolation besitzt, läßt sich nach den dargestellten Ergebnissen so nicht aufrechterhalten. Schon in vivo-Ergebnisse lassen eine relativ geringe toxische Wirkung auf Zellen vermuten (43, 52, 100), wobei hier auch Unterschiede bezüglich des Zeitpunktes des Beginns der HU-Infusion und der HU-Konzentration bestehen. Die toxische Wirkung auf Leberzellen scheint in der G_1-Phase gering, in der S-Phase dagegen wesentlich höher zu sein (41). Gleichfalls zeigt sich in vitro kein wesentlich schlechteres Einfluß der Bedingungen des "unbalanced growth" auf das Verhalten der Leberzellen. Denn nicht nur nach HU-Infusionsbehandlung im Anschluß an eine Hepatektomie zeigen die Leber-

zellen keine wesentliche DNA-Synthese in vitro mehr, sondern auch während der Zellinkubation regenerierender Leberzellen ohne HU-Vorbehandlung kommt es nicht zu einer echten Zunahme des DNA-Gehaltes der Zellen. In der Zunahme des Zellschutts bei längerer Inkubation (Abb. 17, Abb. 19) läßt sich kein Unterschied zwischen den einzelnen Versuchen mit und ohne HU-Behandlung erkennen. Weitere Erkenntnisse über in vivo applizierten HU und seine Wirkung auf isolierte Leberzellen während der Inkubation lassen sich aber wegen des überwiegenden Kernzerfalls nicht gewinnen.

Die bei den Autoradiographien gefundene DNA-Synthese von Leberzellen nach HU-Behandlung liegt in ihrem Ausmaß unter derjenigen in vivo nach alleiniger Hepatektomie. Sie ist aber auf die Behandlung der Zellen mit HU zurückzuführen, wie der Vergleich mit unbehandelten Zellen zeigt. Somit wirkt in erster Linie die Zellisolation hemmend auf die DNA-Synthese eines Großteils der Zellen ein (26, 34). Auf die wenigen Zellen, die in vitro eine DNA-Synthese weiterführen, scheint sie zumindest während des Beobachtungszeitraumes wenig Einfluß zu haben. Die weitgehende Synchronisierung des Zellzyklus der Leberzellen nach 2/3-Hepatektomie in vivo durch HU läßt sich auch an isolierten Zellen unmittelbar nach Isolation noch nachweisen (Abb. 18a, 18b).

Über die Unterschiede zu den in vivo Ergebnissen ist im Abschnitt der ICP-Diskussion berichtet worden. Über die Veränderungen im Ploidiemuster durch alleinige Hepatektomie hinaus (102, 121) führt HU zu einer relativen Abnahme der 4c Zellen, weniger ausgeprägt auch der 8c Zellen (Abb. 16). Überraschend erscheint die Zunahme der Zellzahl mit einem DNA-Gehalt zwischen den einzelnen Zellklassen auch während der HU-Infusion. Von Walters et al. wurde während der HU-Behandlung an G_1-synchronisierten chinesischen Hamsterzellen eine DNA-Synthese beobachtet. Dabei wird die Frage gestellt, ob die üblichen Untersuchungsmethoden em-

pfindlich genug seien, um auch eine geringe DNA-Synthese festzustellen (46). Sollten sich diese Ergebnisse auch an Leberzellen nach Hepatektomie und HU-Behandlung bestätigen lassen, wären daraus folgende Schlußfolgerungen zu ziehen: Auch während der HU-Behandlung synthetisieren die Leberzellen in geringem Ausmaß DNA. Mit der Impulscytophotometrie stünde eine ausreichend empfindliche Methode zur Verfügung um auch geringfügige Veränderungen im DNA-Gehalt der Zellen nachzuweisen.

5. Zusammenfassung

Grundlage der hier vorgelegten Arbeit bildet das von RABES und Mitarbeitern entwickelte System der Synchronisierung von Rattenleberzellen in vivo durch 2/3-Hepatektomie und anschließende HU-Infusion über 25 Stunden. Es wurde untersucht, wie sich Leberzellen nach dieser Vorbehandlung in vivo bezüglich ihrer DNA-Synthese in vitro nach Isolierung aus dem Organverband während einer kurzen Inkubationsdauer verhalten.

Zur Zellisolation wurde die 2-Stufen-Perfusionsmethode nach Seglen modifiziert und als Organperfusion in situ durchgeführt. Die weitere Zellpräparation erbrachte eine Einzelzellsuspension mit ausreichender Zellzahl für die Durchführung folgender Versuche:
Autoradiographische Auswertung von Zellausstrichen nach Inkubation und 30-minütiger Pulsmarkierung mit 3H-Thymidin.
Flüssigkeitsscintillationsmessung der Radioaktivität im säureunlöslichen Präzipitat der Zellsuspension nach Markierung mit 3H-TdR.
Impulscytophotometrische Untersuchungen nach Färbung der Zellkerne mit Ehtidiumbromid.

Nach Hepatektomie und HU-Infusion konnten ausreichend Zellen mit einer durchschnittlichen Vitalität von ca. 50% isoliert werden. Bei nicht vorbehandelten Leberzellen lag die Zellvitalität bei gleicher Zellzahl über 80%, ein Wert, wie er auch in der Literatur als optimal angegeben wird.

Im Vergleich zu Leberzellen unbehandelter Tiere zeigen Leberzellen nach Hepatektomie und HU-Infusion während der Zellinkubation eine eindeutige Zunahme der Radioaktivität in der Scintillationsmessung, autoradiographisch zeigen in der 3. Stunde nach HU-Block-Ende maximal 19% aller Zellen die Fortführung ihrer DNA-Synthese.

Die Abnahme der Zellvitalität in der Trypanblaufärbung und mikroskopisch sichtbare Verschlechterung der Zellmorpholo-

gie während der Zellinkubation zeigen, daß der größte Teil der Zellen während der Inkubation zugrunde geht.

Die Auswertung der Histogramme erlaubt eine annähernde prozentuale Abschätzung der Histogrammveränderungen im Vergleich zum Standardhistogramm von Leberzellen unbehandelter Tiere.
Histogramme von Leberzellen, die in zunehmenden Abständen nach HU-Infusionsende isoliert wurden, bestätigen im wesentlichen die in vivo ermittelten Ergebnisse, wenn die Histogramme unmittelbar nach Zellisolation ohne Inkubation angefertigt werden. Nach den Histogrammen ist ein unterschiedliches Verhalten hinsichtlich der DNA-Synthesegeschwindigkeit zwischen diploiden und tetraploiden Zellen festzustellen.

Die Histogramme während Inkubation von vorbehandelten Tieren werden ausschließlich von der deutlichen Zunahme des Zelldetritus über die ganze Histogrammabszisse hinweg bestimmt. Zunächst erscheint dies wie eine Zunahme der Zellen im Zwischenbereich zwischen den einzelnen Peaks, im Sinne einer Zunahme der DNA-Synthese dieser Zellen. Eine tatsächliche Zunahme der Zellfraktion in der S-Phase ist aber nicht zu erkennen, auch kommt die in den Autoradiographien nachgewiesene Fraktion markierter Zellen in den Histogrammen nicht zum Ausdruck. Leberzellhistogramme nach Zellisolation in zunehmenden Abständen nach 2/3-Hepatektomie zeigen neben der Veränderung im Ploidiemuster schon in den ersten Stunden nachHepatektomie eine Zunahme der Zellen im S-Phasebereich. Auch während der 25-stündigen HU-Infusion nimmt dieser Histogrammanteil zu. Dabei scheinen methodische, interpretatorische und technische Schwierigkeiten bei Anfertigung und Auswertung der Histogramme eine besondere Rolle zu spielen. Fragen zur DNA-Dichte und -Struktur am Übergang von der G_1- zur S-Phase während der HU-Infusionsbehandlung bedürfen in diesem Zusammenhang der weiteren Klärung.

Autoradiographie, Scintillationsmessung und impulscytophotometrische Methoden liefern wertvolle, sich ergänzende Ergebnisse, die bei der vorliegenden Fragestellung notwendig sind, um Fehlinterpretationen zu vermeiden.

Bei der Fragestellung der DNA-Synthese isolierter Leberzellen in vitro bedarf neben Anwendung optimaler Kulturbedingungen die Isolation der Zellen aus ihrem Organverband der besonderen Untersuchung.

Abbildung 1 : SCINTILLATIONSMESSUNG

A:Leberzellen einer Ratte(2oo gr KG) nach 2/3-Hepatektomie und 25-stündiger HU-Infusion(14 Std.nach Hep.)
Stündliche Inkubation mit 3-HTdR für jeweils 3o min
Beginn der Leberperfusion unmittelbar nach HU-Infusionsende
Dauer der Zellisolation: 7o-75 min
Beginn der Inkubation: 1^{o} 3o min nach HU-Infusionsende
Beginn der 1.Messung: 2 Stunden nach HU-Ende.
Anzahl der Versuche(n) 5
Ordinate:cpm/Einzelzelle x $1o^{-4}$
Abscisse:Stunden nach HU-Ende,Versuchsdauer: 9 Stunden

B:Kontrollversuche (Ratte 2oo gr KG)
a.Leberzellen unmittelbar nach Hepatektomie isoliert, ohne HU-Infusion.(n=1)
b.Leberzellen bis zur 14.Stunde nach Hepatektomie isoliert. (n=1)
Ordinate:cpm/Einzelzelle x $1o^{-5}$

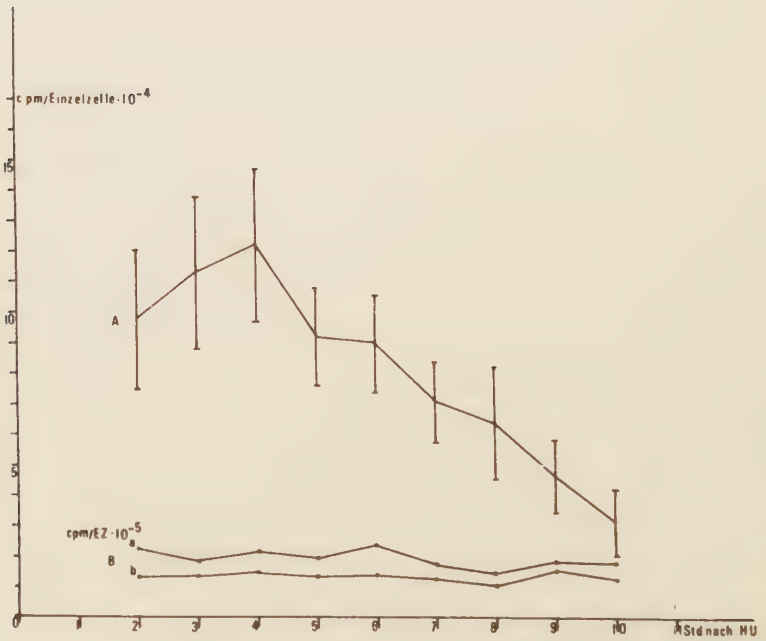


Abbildung 2 : SCINTILLATIONSMESSUNG

Leberzellen,Ordinate und Abscisse wie Abb 1 A .
Stündliche Inkubation der Leberzellen mit 3-HTdR für jeweils 3o min.
Beginn der Leberperfusion: 1° 15 min nach HU-Ende
Dauer der Zellisolation :7o-75 min
Beginn der Inkubation: 2° 3o min nach HU-Ende
Beginn der 1.Messung: 3 Stunden nach HU-Ende
Versuchsdauer: 6 Stunden, n=4

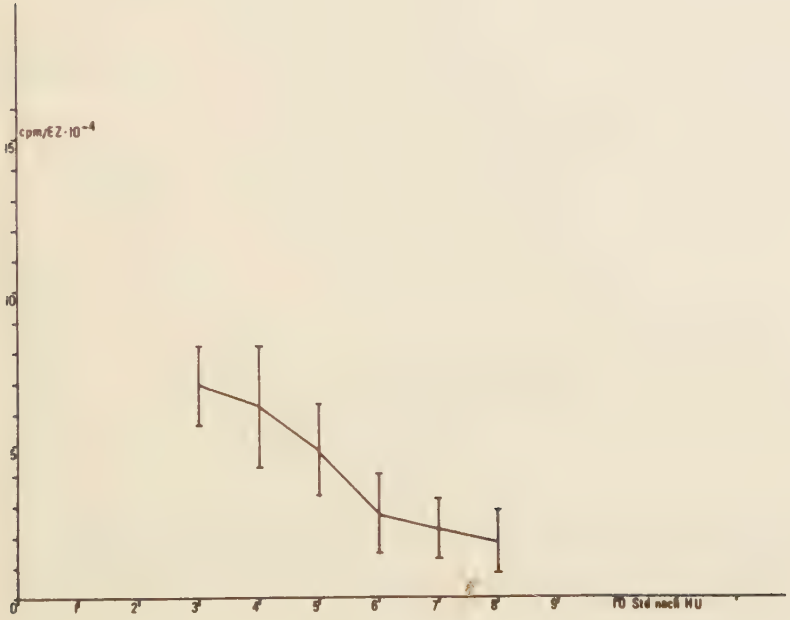


Abbildung 3 : SCINTILLATIONSMESSUNG

Leberzellen,Ordinate und Abscisse wie Abb. 1 A
Stündliche Inkubation der Leberzelln mit 3-HTdR für jeweils 3o min
Beginn der Leberperfusion: 2° 45 min nach HU-Ende
Dauer der Zellisolation : 7o-75 min
Beginn der Zellinkubation: 4 Stunden nach HU-Ende
Beginn der 1.Messung: 4° 3o min nach HU-Ende
Versuchsdauer: 6 Stunden,n = 3

Abbildung 4 : SCINTILLATIONSMESSUNG

Leberzellen,Ordinate und Abscisse wie Abb 1 A
Stündliche Inkubation der Leberzellen mit 3-HTdR für jeweils 3o min

Beginn der Leberperfusion: 3^{o} 45 min nach HU-Ende
Dauer der Zellisolation: 7o-75 min
Beginn der Zellinkubation: 5 Stunden nach HU-Ende
Beginn der 1.Messung: 5^{o} 3o min nach HU-Ende
Versuchsdauer: 8 Stunden, n= 1

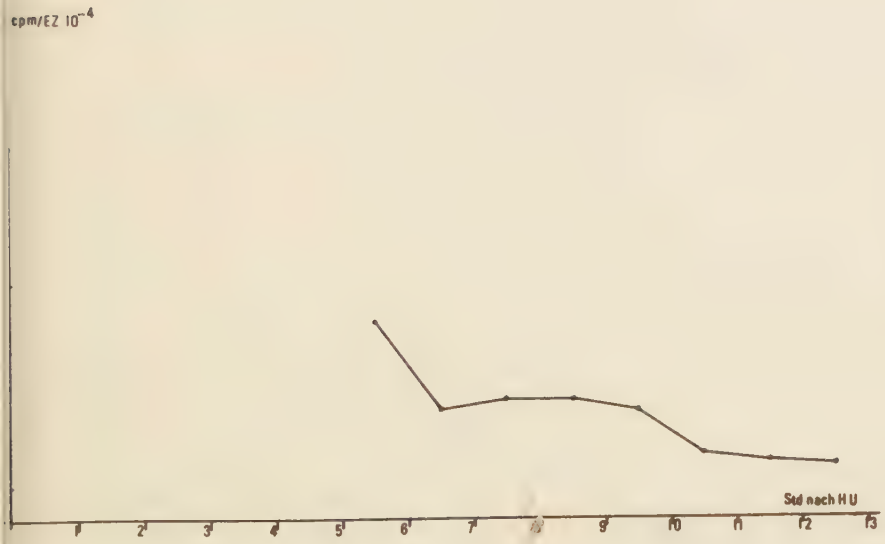


Abbildung 5 : SCINTILLATIONSMESSUNG

Leberzellen,Ordinate und Abscisse wie in Abb 1 A
Stündliche Inkubation der Leberzellen mit 3H-TdR für jeweils 3o min

Beginn der Leberperfusion: 5^{o} 45 min nach HU-Ende
Dauer der Zellisolation: 7o-75 min
Beginn der Zellinkubation: 7 Stunden nach HU-Ende
Beginn der 1.Messung: 7^{o} 3o min nach HU-Ende
Versuchsdauer: 6 Stunden,n = 3

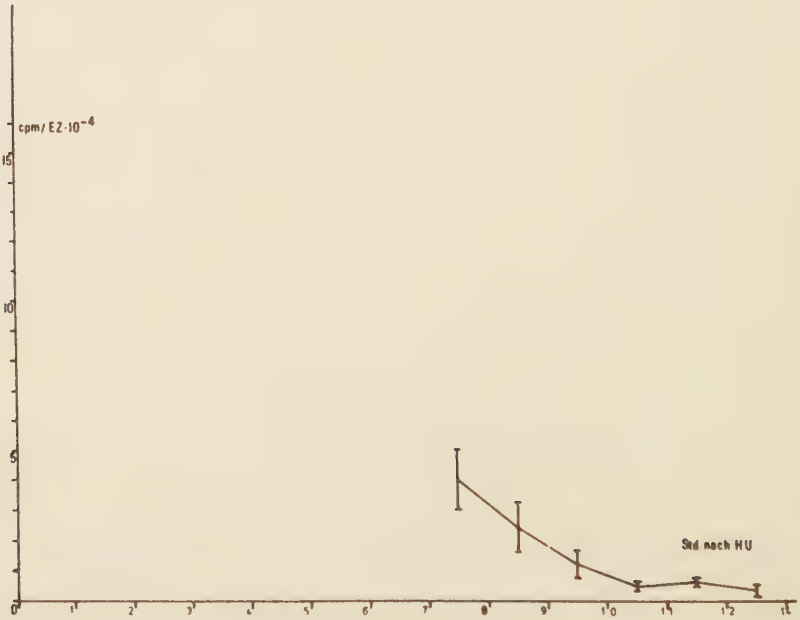


Abbildung 6 : AUTORADIOGRAPHIE

Leberzellen einer Ratte(2oo gr KG)nach 2/3-Hepatektomie und 25-stündiger HU-Infusion(14 Stunden nach 2/3-Hep)
Stündliche Inkubation der Leberzellen mit 3H-TdR für jeweils 3o min.
Beginn der Leberperfusion:unmittelbar nach HU-Infusionsende
Dauer der Zellisolation:7o-75 min
Beginn der Zellinkubation: 1^{o} 3o min nach HU-Ende
Beginn der 1.Messung: 2 Stunden nach HU-Ende
Versuchsdauer: 9 Stunden,n = 3

Kurve A (———):Prozentzahl markierter Zellen pro 1ooo Zellen pro Präparat.
(durchgezogene Ordinate)
Kurve B (-----):prozentualer Anteil dicht markierter Zellen(25 Silberkörner über dem Zellkern) an der Gesamtzahl aller markierten Zellen
(gestrichelte Ordinate)
Abscisse:Stunden nach HU-Infusionsende

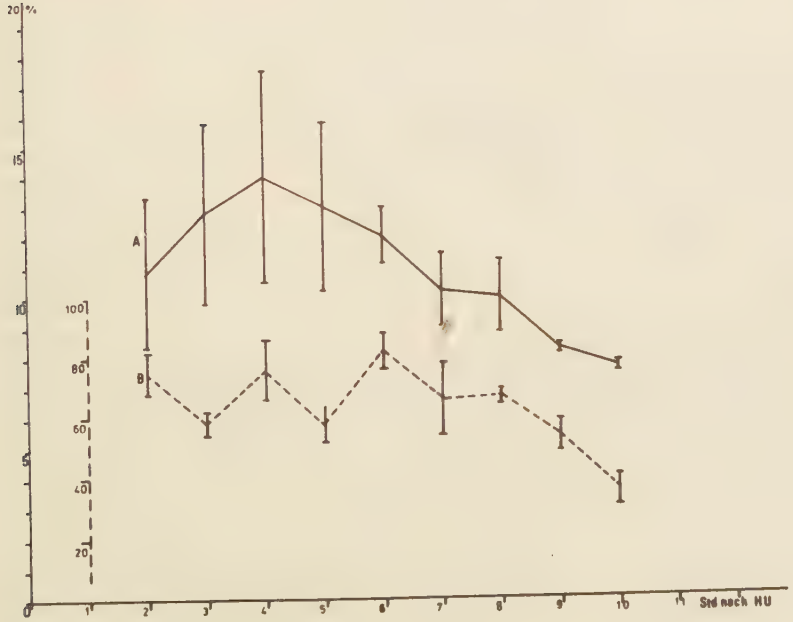


Abbildung 7 : AUTORADIOGRAPHIE

Leberzellen,Ordinate,Abscisse und Kurvendarstellung wie in Abb 6

Stündliche Inkubation der Leberzellen mit 3H-TdR für jeweils 3o min

Beginn der Leberperfusion: $1^{o}45$ min nach HU-Ende

Dauer der Zellisolation:7o-75 min

Beginn der Zellinkubation: 2^{o} 3o min nach HU-Ende

Beginn der 1.Messung: 3Stunden nach HU-Ende

Versuchsdauer: 6 Stunden, n = 3

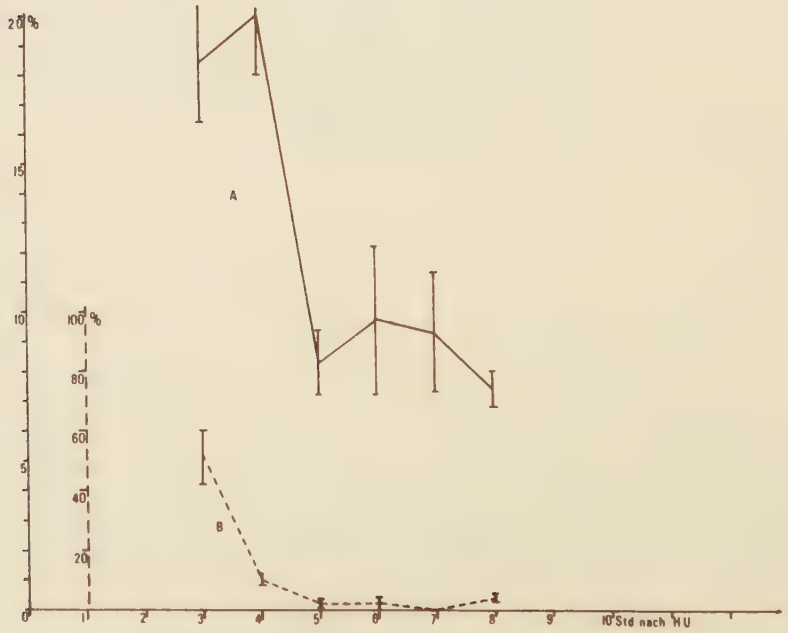


Abbildung 8 : AUTORADIOGRAPHIE

Leberzellen,Ordinate,Abscisse und Kurvendarstellung wie in Abb 6

Stündliche Inkubation der Leberzellen mit 3H-TdR für jeweils 3o min

Beginn der Leberperfusion: 3^{o} 45 min nach HU-Ende

dauer der Zellisolation: 7o-75 min

Beginn der Zellinkubation: 5 Stunden nach HU-Ende

Beginn der 1.Messung: 5^{o} 3o min nach HU-Ende

Versuchsdauer: 7 Stunden, n = 3

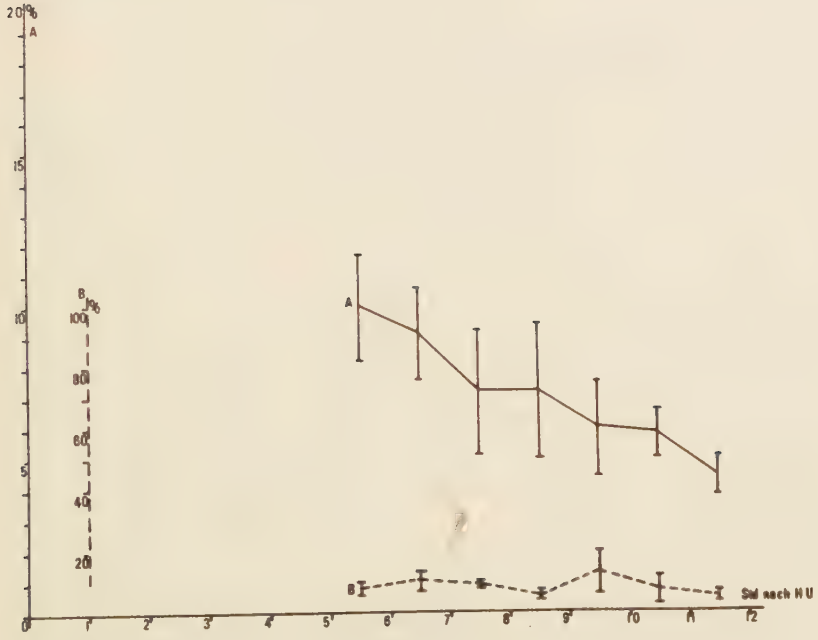


Abbildung 9 : AUTORADIOGRAPHIE

Leberzellen,Ordinate,Abscisse und Kurvendarstellung wie in Abb 6

Stündliche Inkubation der Leberzellen mit 3H-TdR für jeweils 3o min

Beginn der Leberperfusion: 4^{o} 45 min nach HU-Ende

Dauer der Zellisolation: 7o-75 min

Beginn der Zellinkubation: 6 Stunden nach HU-Ende

Beginn der 1.Messung: 6 Stunden nach HU-Ende

Versuchsdauer: 7 Stunden ,n = 1

Pro Meßpunkt wurden von diesem Versuch jeweils 3 Präparate zu je 5oo Zellen ausgezählt(Standardabweichung)

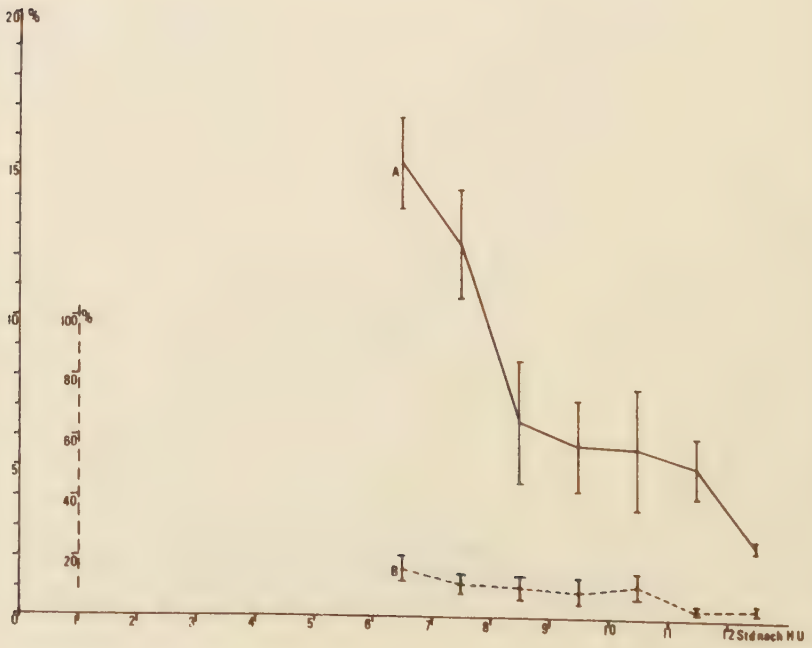


Abbildung 1o und 11 : IMPULSCYTOPHOTOMETRIE

Histogramm A : Hühnererythrozyten zur technischen Eichung des ICP-11 (von der Herstellerfima als fertige Zellsuspension geliefert)
Peak A :96,4 %aller Zellen liegen im Peakmittel im Kanal 1o.
Rest: 3,6 % liegen bei Kanal 2o:Zellaggregation einzelner Erythrozyten bzw von Zellfragmente miteinander.

Histogramm B : Thymozyten 21 Tage alter Ratten
Biologische Eichung:
Peak B :diploide Zellen,75 % der Zellkerne bei Kanal 25
Peak C und Zwischenbereich zwischen B und C: Aggregation von diploiden Zellkernen und Kernfragmenten (25 %)

High Voltage(HV):4,5(= 475 Volt),Amplification:1o

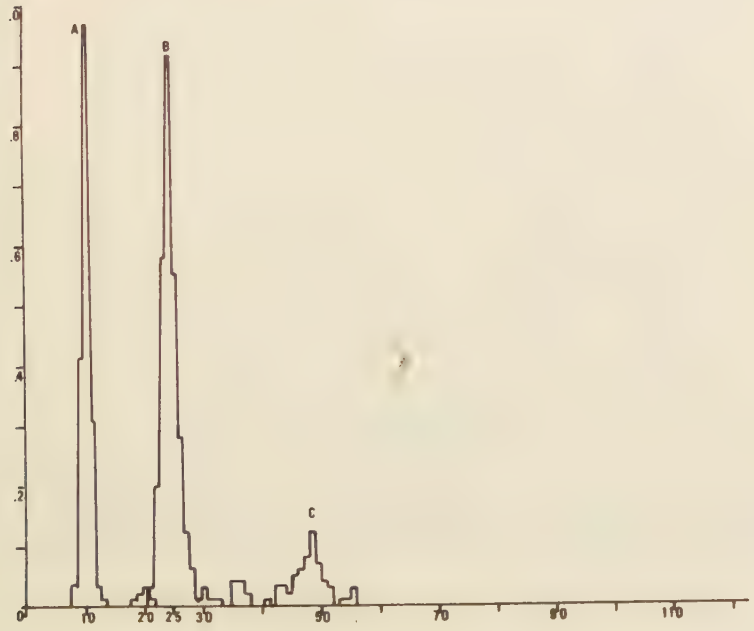


Abbildung 12 : IMPULSCYTOPHOTOMETRIE

Standardhistogramm: Leberzellen einer Ratte (2oo gr KG)
unmittelbar nach 2/3-Hepatektomie
isoliert (= unbehandelt)

Histogrammabschnitte:	a diploide Zellen	35,3%
	b tetraploide Zellen	55,7%
	c octoploide Zellen	4,9%
	e S-Phaseabschnitt zw 2c und 4c	o,8%
	f S-Phaseabschnitt zw 4c und 8c	2,9%
	g S-Phaseabschnitt über 8c	o,1%
	d Zelldetritus links von 2c	1,5%

Der Histogrammabschnitt rechts des tetraploiden Zellpeaks kann durch Umschaltung der Countsvorgabe bei der Histogrammaufzeichung im Verhältnis 1:1o vergrößert dargestellt werden um eine bessere Auswertung zu ermöglichen.

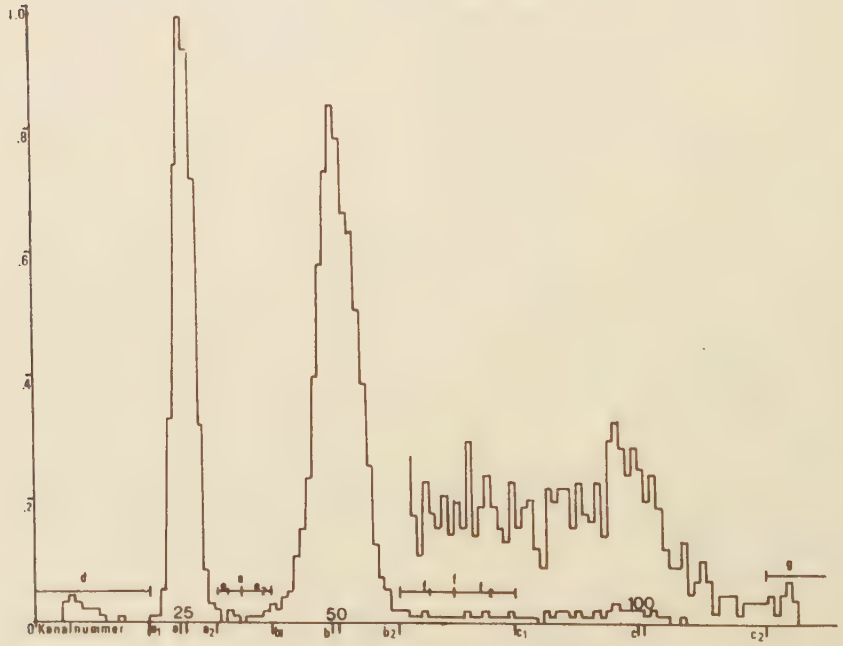


Abbildung 13 : IMPULSCYTOPHOTOMETRIE

Histogramm von Leberzellen,24 Stunden nach 2/3-Hepatektomie isoliert.Verschiebung der Peakmaxima a,b und c nach rechts auf der Abscisse als Ausdruck einer zunehmenden DNA-Synthese 24 Stunden nach Hepatektomie.
Die Auswertung aller Histogramme mit Ausnahme des Standardhistogramms erfolgt nach der dargestellten Einteilung in die Abschnitte I,II,III und IV.Durch Übertragung der 2c, 4c und 8c-Peaks des Standardhistogramms auf die einzelnen Abschnitte und durch die Subtraktion können die Histogrammveränderungen prozentual ermittelt werden.

Die für dieses Histogramm ermittelten Werte sind im Zusammenhang in Abb 27 dargestellt.

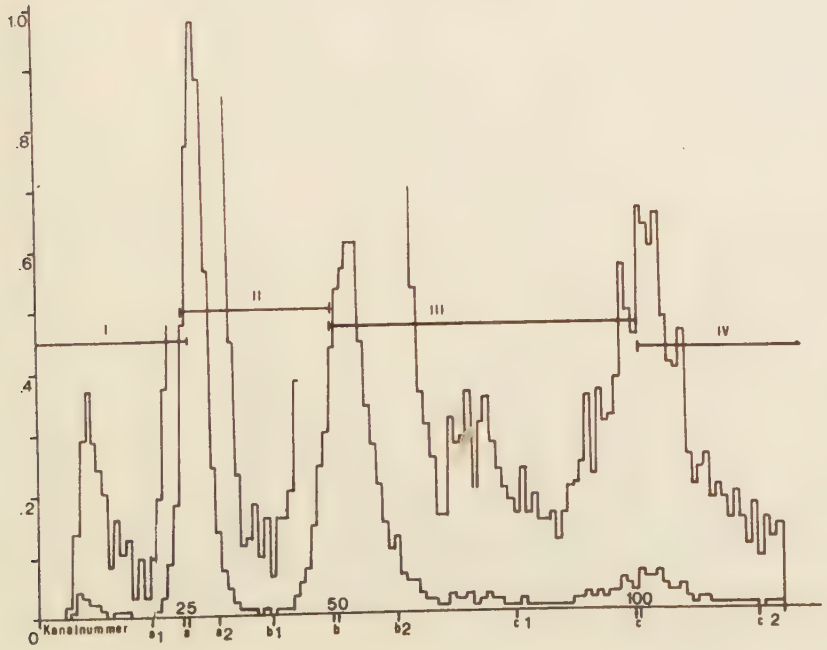


Abbildung 14 : IMPULSCYTOPHOTOMETRIE

Histogramm von Leberzellen einer 35o gr schweren Ratte, die unmittelbar nach der Hepatektomie isoliert wurden. (= unbehandelte Leberzellen)

a diploide Zellen	23,7 %
b tetraploide Zellen	66,6 %
c octoploide Zellen	4,5 %
d Zelldetritus links der diploiden Zellen	o,o
e S-Phasebereich zw 2c und 4c	o,3 %
f S-Phasebereich zw 4c und 8c	4,6 %
g S-Phasebereich über 8c	o,o6%

Vergrößerung des Abschnittes rechts vom 4c-Peak 1:1o

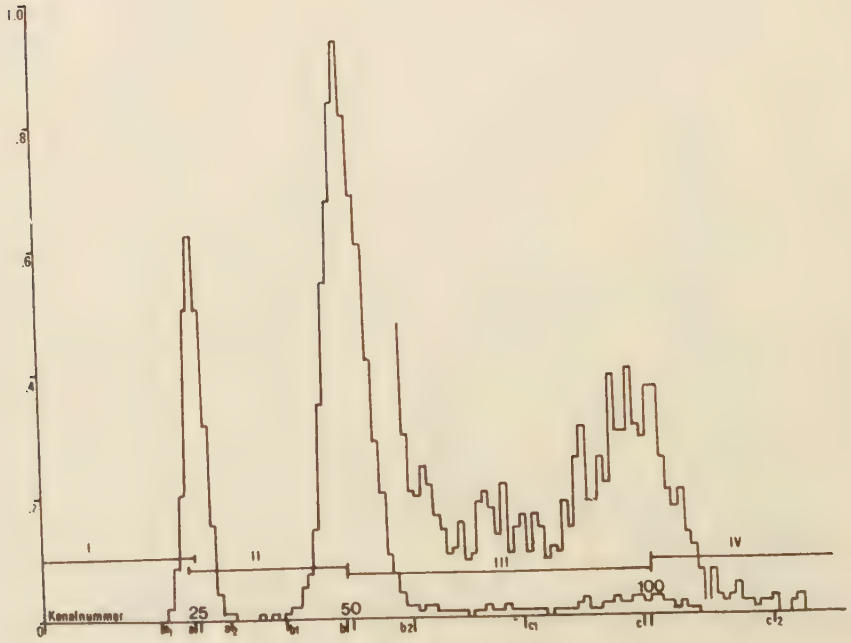


Abbildung 15 :IMPULSCYTOPHOTOMETRIE

Veränderungen im Ploidiemuster von Leberzellen,mit zunehmenden Abständen nach 2/3-Hepatektomie,verglichen mit Leberzellen unbehandelter Ratten (2oo gr bzw 35o gr KG)
Diploide,tetraploide und octoploide Zellpeaks
A Leberzellen eines 35o gr schweren Tieres,unbehandelt
B Leberzellen eines 2oo gr schweren Tieres,unbehandelt
C Leberzellen(2oo gr-Tier) 3 Stunden nach 2/3-Hep isoliert
D " " " " 12 " " " "
E " " " " 14 " " " "
F " " " " 24 " " " "
G " " " " 48 " " " "
H " " " " 72 " " " "

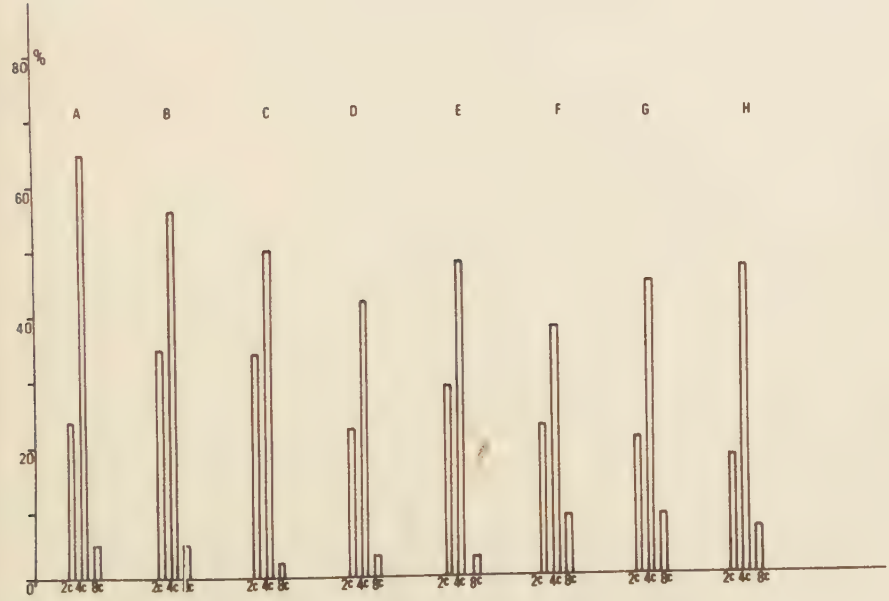


Abbildung 16 : IMPULSCYTOPHOTOMETRIE

Veränderungen im Ploidiemuster von Leberzellen,mit zunehmenden Abständen nach 2/3-Hepatektomie,verglichen mit Leberzellen unbehandelter Ratten(2oo gr bzw 35o gr KG) gesamter S-Phasebereich(S),Zwischenbereich zwischen 2c und 4c (e) bzw 4c und 8c (f)

Einteilung A-H siehe Abb 15

Zwischenbereiche:Einteilungin frühe und späte S-Phase

	e_1	e_2	f_1	f_2
A	o,1 %	o,19 %	2,5 %	2,2 %
B	o,41%	o,43 %	1,4 %	1,5 %
C	4,4 %	6,3 %	1,8 %	1,5 %
D	13,2 %	o,1 %	18.7 %	o,4 %
E	4,4 %	9,4 %	2,8 %	3,3 %
F	15,4 %	o,1 %	9,6 %	2,4 %
G	5,2 %	7,7%	9,8 %	o,9 %
H	7,1 %	1,o %	17,o %	1,o %

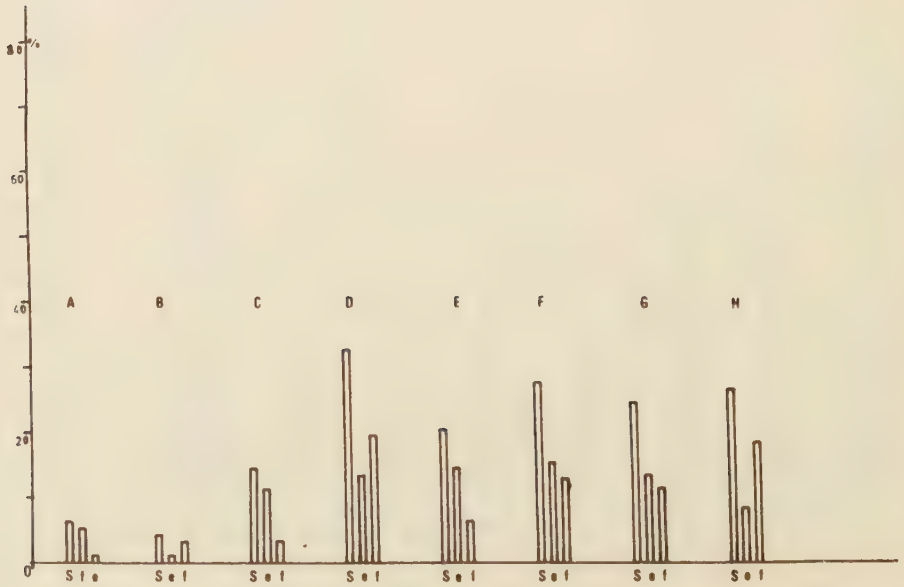


Abbildung 17 a : IMPULSCYTOPHOTOMETRIE

Ergebnisse der Histogrammauswertung nach der beschriebenen Auswertungsmethode.
Leberzellen, 14 Stunden nach 2/3-Hepatektomie isoliert, 7-stündige in vitro Inkubation der Zellsuspension.

a (------) diploide Zellkerne
b (– – –) tetraploide Zellkerne
c (-.-.-.) octoploide Zellkerne
d (-..-..-) Zelldetritus vor dem 2c-Peak
$\overline{ef}$(————) gesamter S-Phasebereich

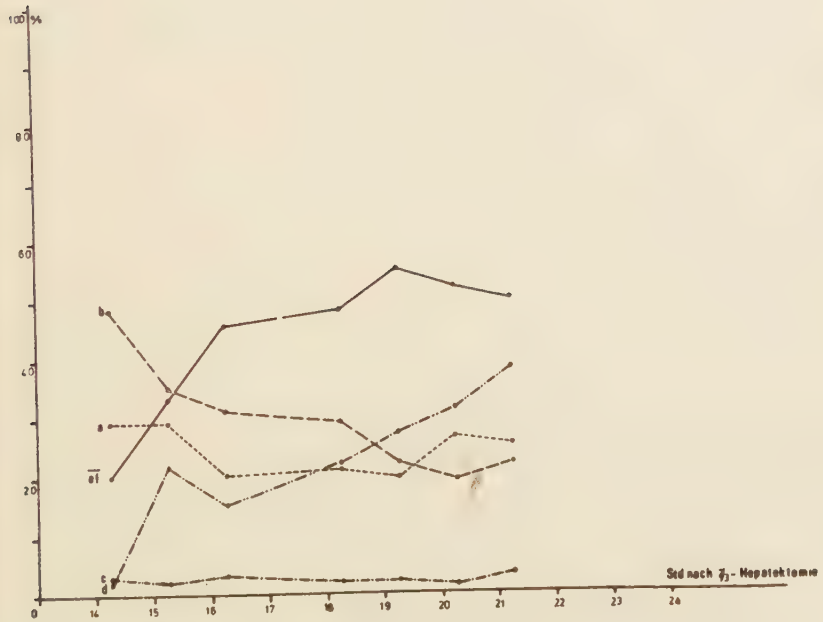


Abbildung 17 b : IMPULSCYTOPHOTOMETRIE

Ergebnisse der Histogrammauswertung nach der beschriebenen Auswertungsmethode.
Leberzellen, 14 Stunden nach 2/3-Hepatektomie isoliert, 7-stündige in vitro Inkubation der Zellsuspension.

Aufteiung des gesamten S-Phasebereiches $\overline{ef}$

$\overline{e}$ S-Phasebereich zwischen 2c und 4c (————)
e_1 "frühe" S-Phase (– – – –)
e_2 "späte" S-Phase (--------)
$\overline{f}$ S-Phasebereich zwischen 4c und 8c (————)
f_1 "frühe" S-Phase (– – – –)
f_2 "späte" S-Phase (--------)

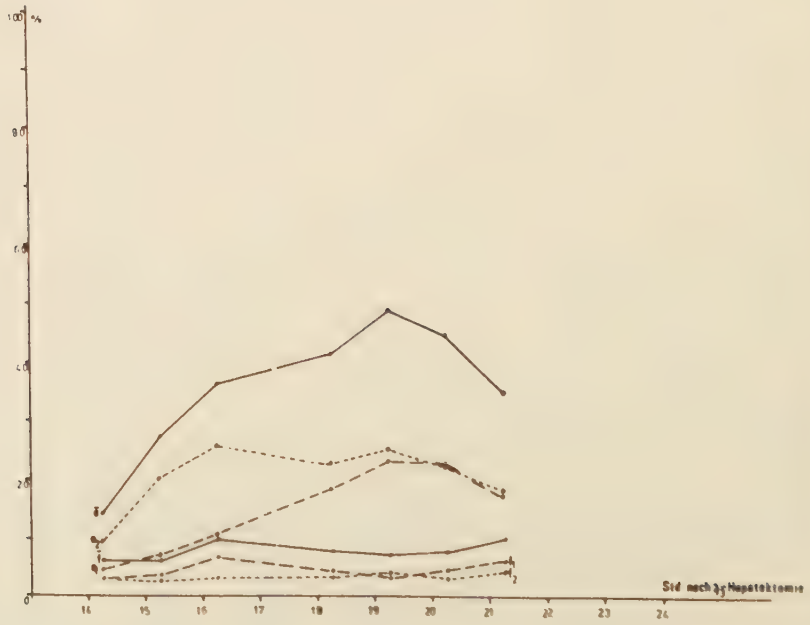


Abbildung 18 a :IMPULSCYTOPHOTOMETRIE

Ergebnisse der Histogrammauswertung

Leberzellen nach 2/3-Hepatektomie und 25-stündiger HU-Dauerinfusion

Zunehmender zeitlicher Abstand zwischen HU-Infusionsende und Beginn der Leberzellisolation (s.Text)

Die Histogramme werden unmittelbar nach der Zellisolation angefertigt (= vorbehandelte Leberzellen ohne in vitro Inkubation).

Ordinate:Prozentanteil der einzelnen Histogrammabschnitte am Gesamthistogramm

Abscisse:Stunden nach HU-Infusionsende(0= HU-Infusionsende)

a (------) diploide Zellkerne

b (– – –) tetraploide Zellkerne

c (-.-.-.) octoploide Zellkerne

$\overline{ef}$ (———) gesamter S-Phasebereich

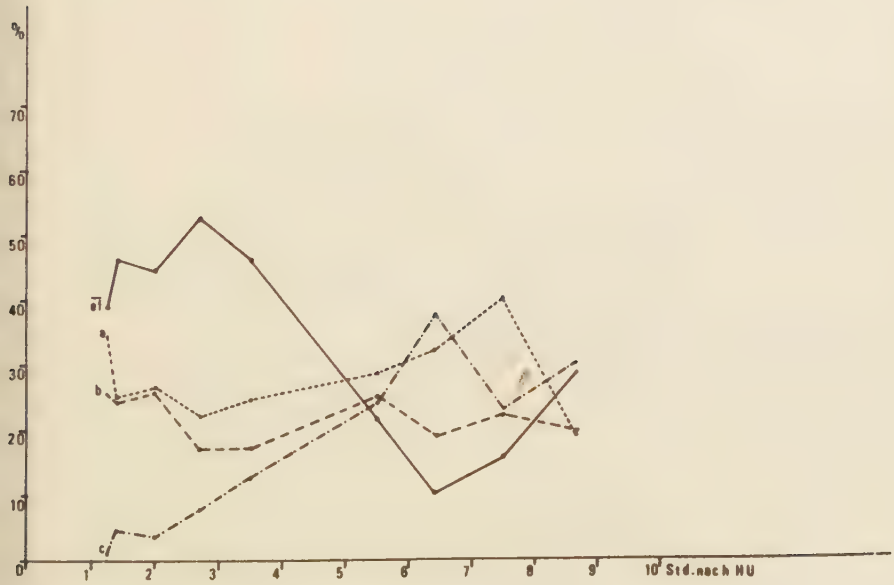


Abbildung 18 b :IMPULSCYTOPHOTOMETRIE

Ergebnisse der Histogrammauswertung

Leberzellen nach 2/3-Hepatektomie und 25-stündiger HU-Dauerinfusion

Zunehmender zeitlicher Abstand zwischen HU-Infusionsende und Beginn der Leberzellisolation (s.Text)

Die Histogramme werden unmittelbar nach der Zellisolation angefertigt (= vorbehandelte Leberzellen ohne in vitro-Inkubation).

Ordinate: Prozentanteil der einzelnen Histogrammabschnitte am Gesamthistogramm

Abscisse: Stunden nach HU-Infusionsende

Aufteilung des gesamten S-Phasebereiches:

e Zwischenbereich (S-Phase) zwischen 2c und 4c

f Zwischenbereich (S-Phase) zwischen 4c und 8c

e_1 f_1 frühe S-Phase der einzelnen Zwischenbereiche

e_2 f_2 späte S-Phase der einzelnen Zwischenbereiche

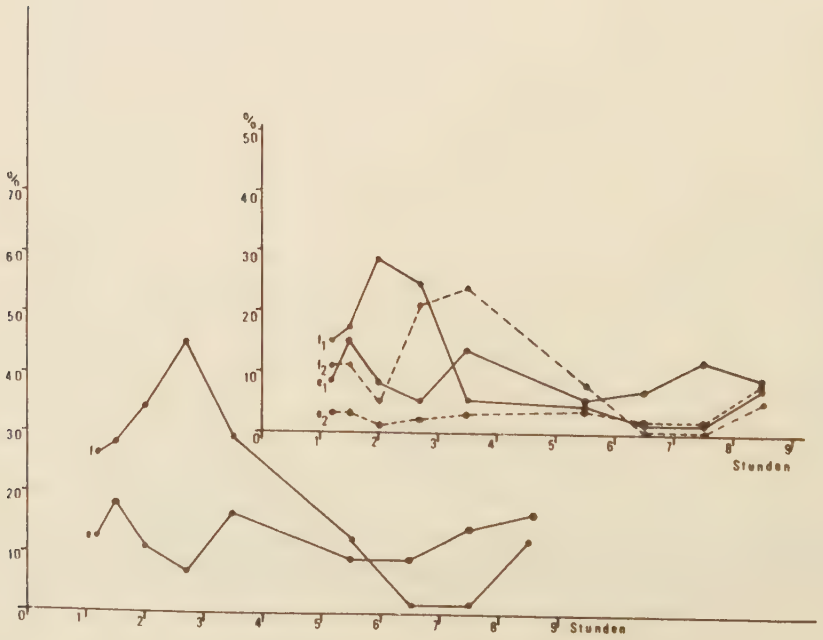


Abbildung 19 : IMPULSCYTOPHOTOMETRIE
Ergebnisse der Histogrammauswertung
Stündliche Histogramme isolierter und inkubierter Leberzellen nach Hepatektomie und 25-stündiger HU-Infusion. Zunehmender zeitlicher Abstand zwischen HU-Infusionsende und Beginn der Zellinkubation.

Zelldetritus (d)vor dem 2c-Peak gelegen

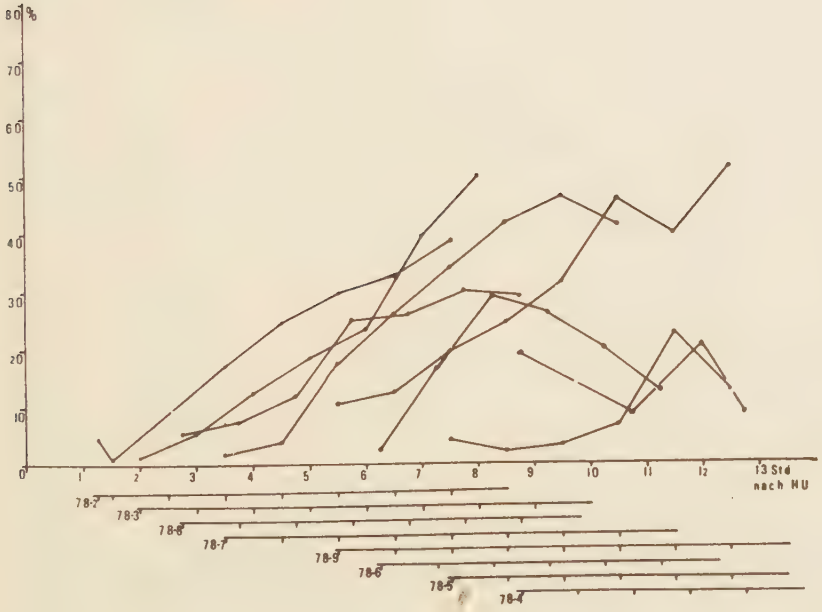


Abbildung 2o a-h :IMPULSCYTOPHOTOMETRIE

Stündliche Histogramme von Leberzellen nach 2/3-Hepatektomie und 25-stündiger HU-Infusion
Beginn der Zellinkubation $3^{o}5o$ min nach HU-Infusionsende
Dauer der Zellinkubation: 7 Stunden

Zunahme des Zelldetritus (d) und Ausbildung einer unimodalen Zerfallshyperbel mit zunehmender Inkubationsdauer.

Abbildung 2o a:ohne Inkubation,unmittelbar nach Isolation

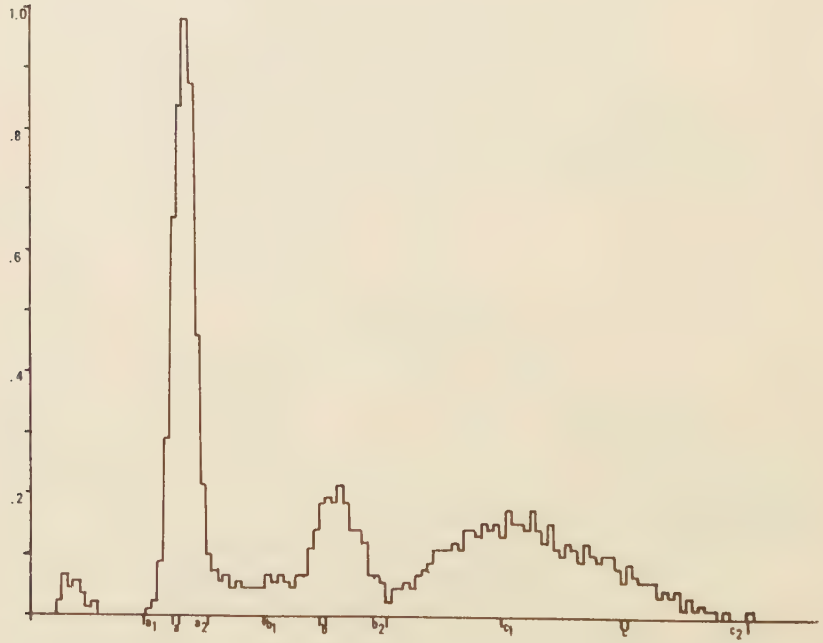
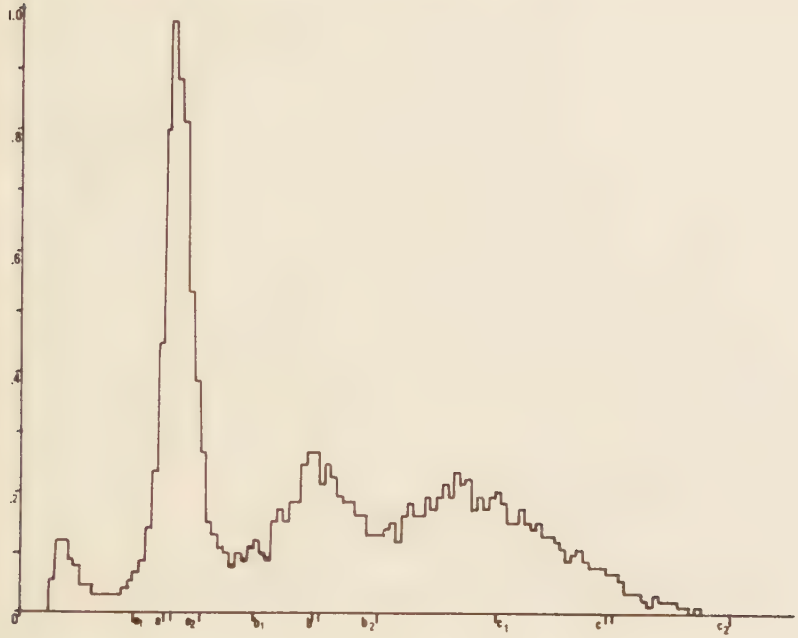


Abbildung 2o b und c:nach 1(a) bzw 2-(b)stündiger Zellinkubation



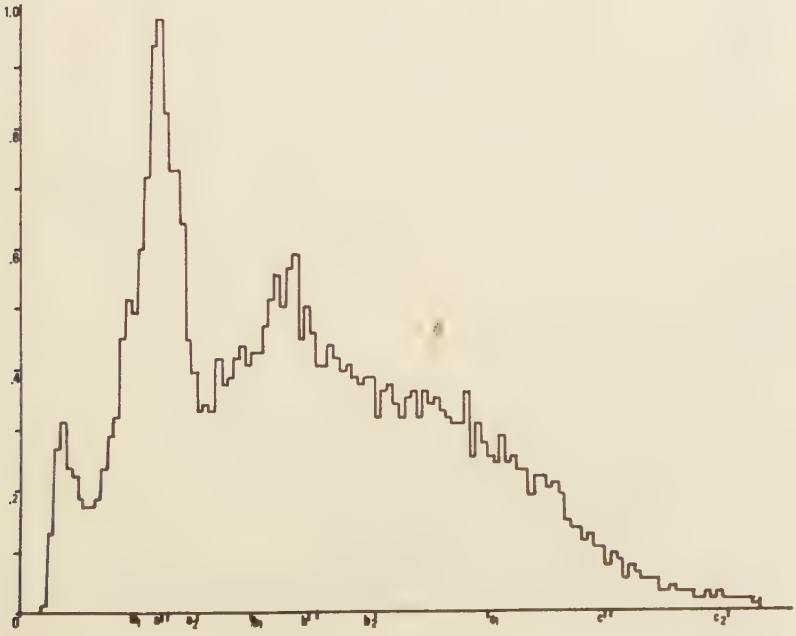
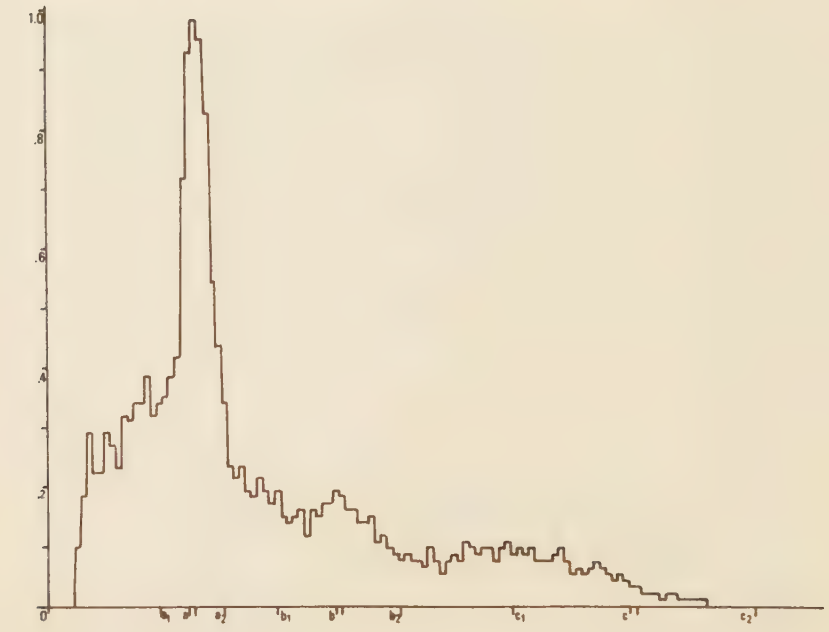


Abbildung 2o d und e: nach 3-(d)bzw 4-(e)stündiger Inkubation



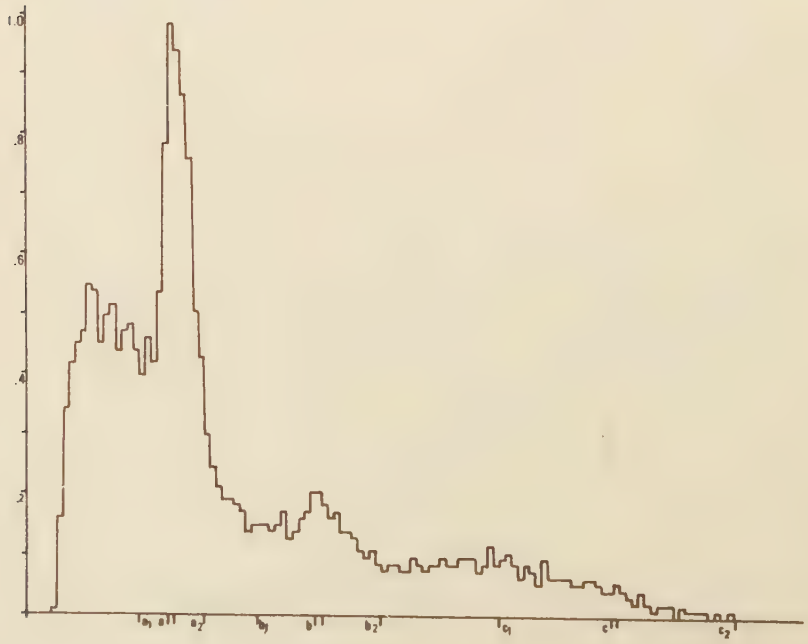
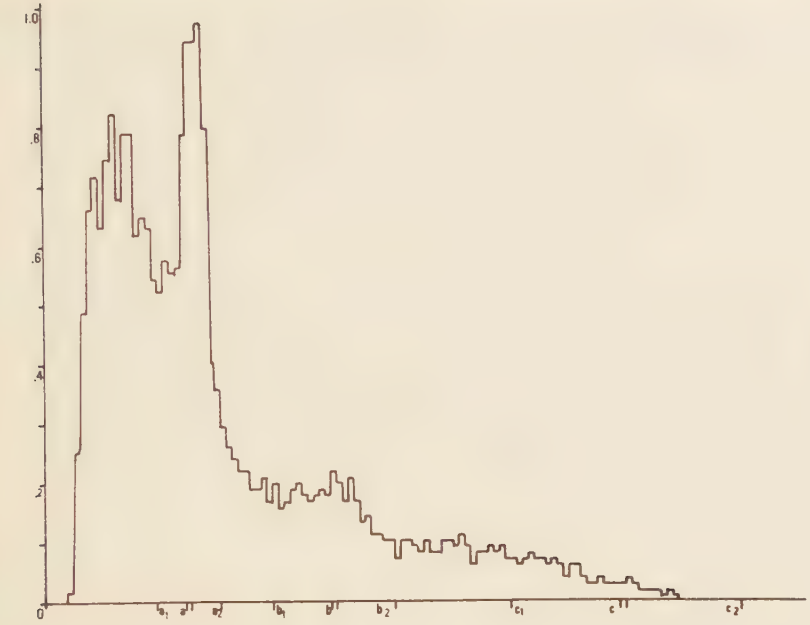


Abbildung 2o f und g:nach 5-(f)bzw 6-(g)stündiger Inkubation



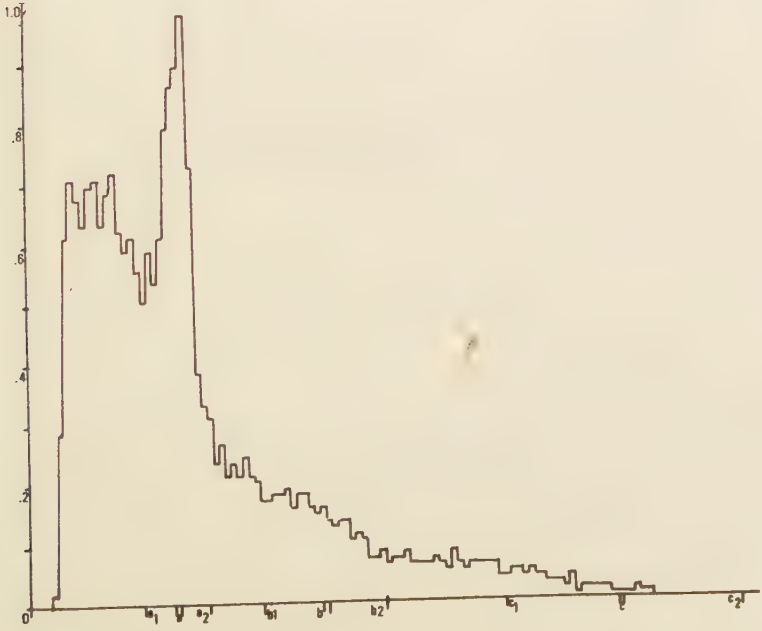


Abbildung 2o h:nach 7-stündiger Inkubation

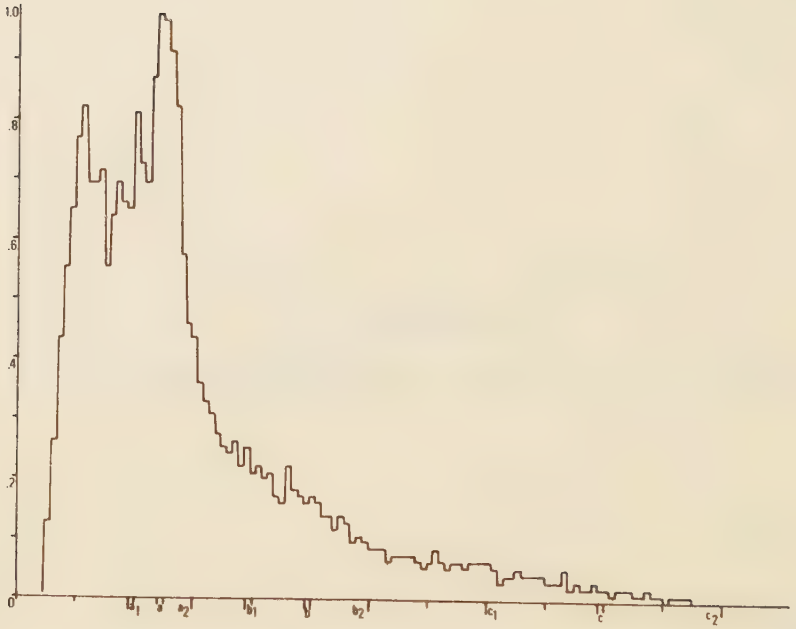


Abbildung 21 a :IMPULSCYTOPHOTOMETRIE

Histogramm von Leberzellen nach hepatektomie und HU-Infusion,unmittelbar nach Zellisolation.

Beginn der Zellisolation $7^{0}25$ min nach HU-Ende

Dauer der Zellisolation ca 75 min

Histogrammanfertigung $8^{0}4o$ min nach HU-Ende

d	Zelldetritus	18,89 %
a	diploide Zellen	15,22 %
b	tetraploide Zellen	15,55 %
c	octoploide Zellen	24,55 %
e	S-Phasebereich zw 2c und 4c	13,42 %
f	S-Phasebereich zw 4c und 8c	9,9o %
g	S-Phasebereich über 8c	2,47 %

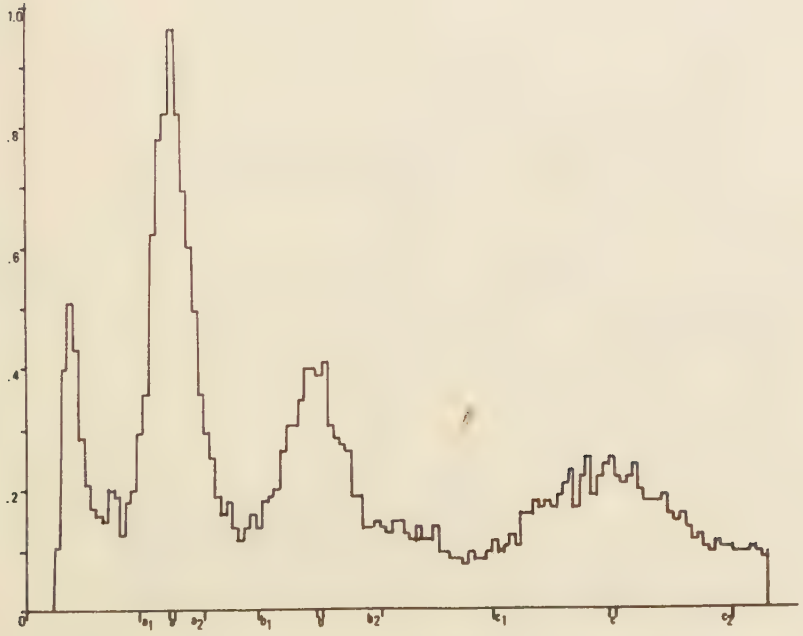


Abbildung 21 b : IMPULSCYTOPHOTOMETRIE

Histogramm von Leberzellen nach Hepatektomie und HU-Infusion,und 3-stündiger Zellinkubation im Anschluß an die Zellisolation.

Beginn der Zellisolation	45 min nach HU-Ende
Dauer der Zellisolation	ca 75 min
Histogrammanfertigung	nach 3-stündiger Zellinkubation
Beginn der Zellinkubation	2^{o} nach HU-Ende

d	Zelldetritus	18,32 %
a	diploide Zellen	16,57 %
b	tetraploide Zellen	17,15 %
c	octoploide Zellen	1,53
e	S-Phasebereich zw 2c und 4c	27,8o %
f	S-Phasebereich zw 4c und 8c	18,45 %
g	S-Phasebereich über 8c	o,15 %

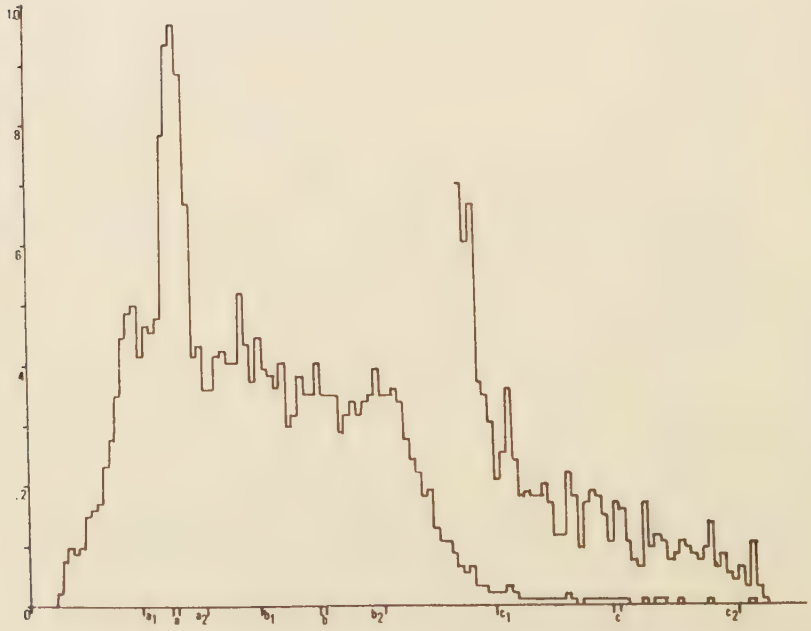


Abbildung 22 : IMPULSCYTOPHOTOMETRIE

Ergebnisse der Histogrammauswertung

gesamter S-Phasebereich $\overline{ef}$

Stündliche Histogramme isolierter und inkubierter Leberzellen nach Hepatektomie und 25-stündiger HU-Infusion. Zunehmender zeitlicher Abstand zwischen HU-Infusionsende und Beginn der Zellinkubation:

Versuch 78-2	1^{o}	2o min nach HU-Ende
78-3	2^{o}	
78-8	2^{o}	4o min
78-7	3^{o}	35 min
78-9	5^{o}	35 min
78-6	6^{o}	2o min
78-5	7^{o}	25 min
78-4	8^{o}	4o min

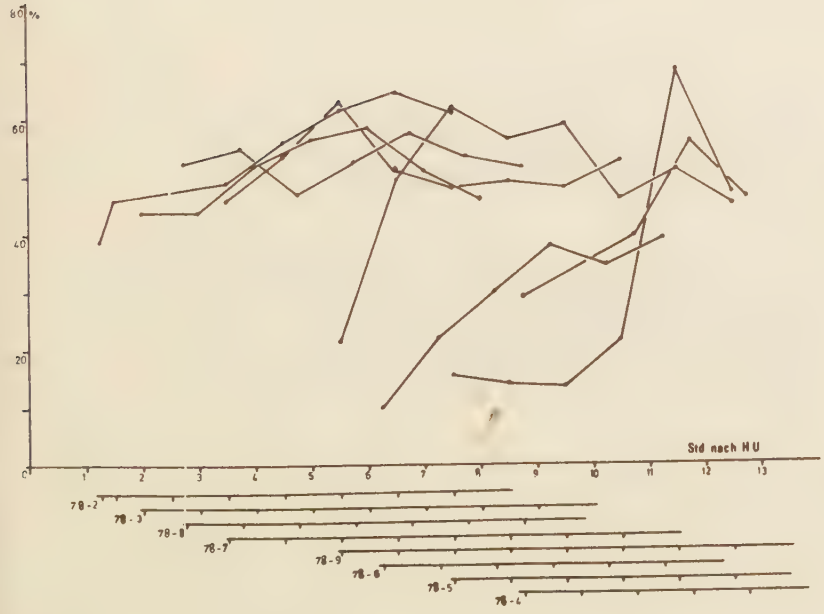


Abbildung 23 : IMPULSCYTOPHOTOMETRIE
Ergebnisse der Histogrammauswertung
2c-Bereich, diploide Zellen
Erläuterungen siehe Abb 22

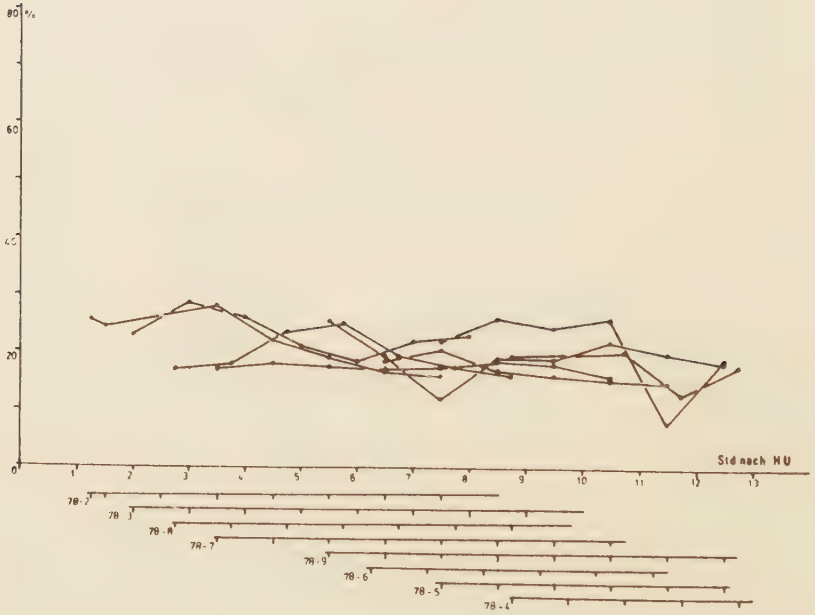


Abbildung 24 : IMPULSCYTOPHOTOMETRIE
Ergebnisse der Histogrammauswertung
4 c-Bereich, tetraploide Zellen
. Erläuterungen siehe Abb 22

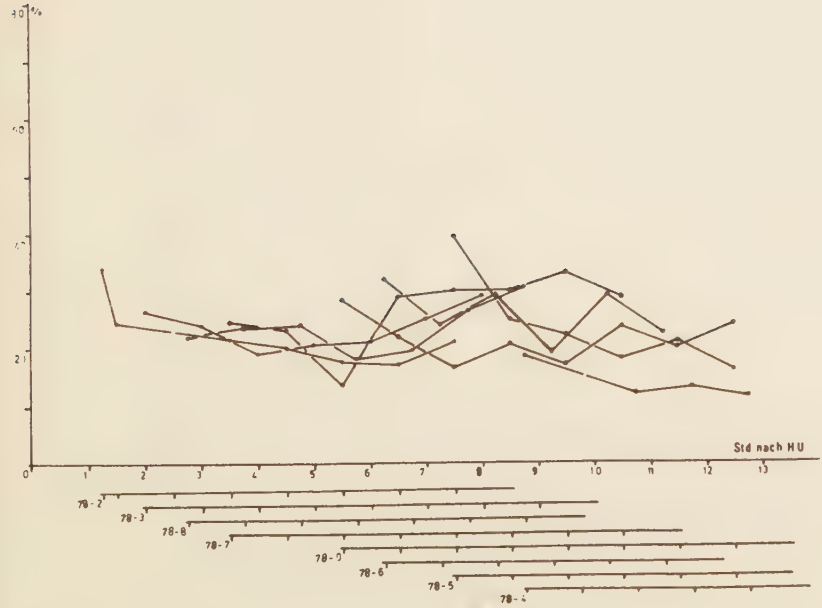


Abbildung 25 : IMPULSCYTOPHOTOMETRIE
Ergebnisse der Histogrammauswertung
8 c-Bereich,octoploide Zellen
Erläuterungen siehe Abb 22

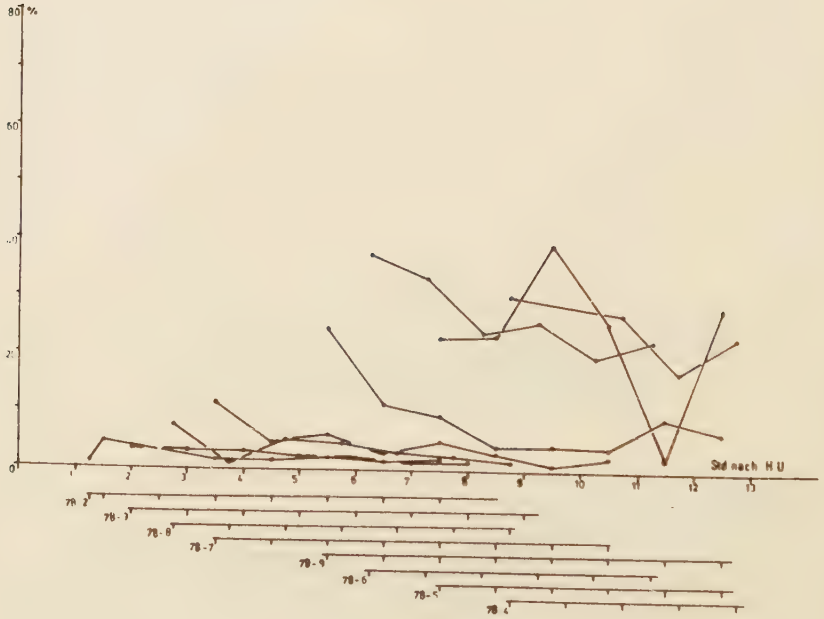


Abbildung 26 :IMPULSCYTOPHOTOMETRIE

Histogramm von Leberzellen einer Ratte (35o gr KG) ohne Hepatektomie und HU-Infusion (s.Abb 14)unmittelbar nach Zellisolation.

Die Zwischenpeaks entstehen durch ein Miß verhältniß zwischen Zahl der inkubierten Zellen und der spezifischen Aktivität der verwendeten RNAse.

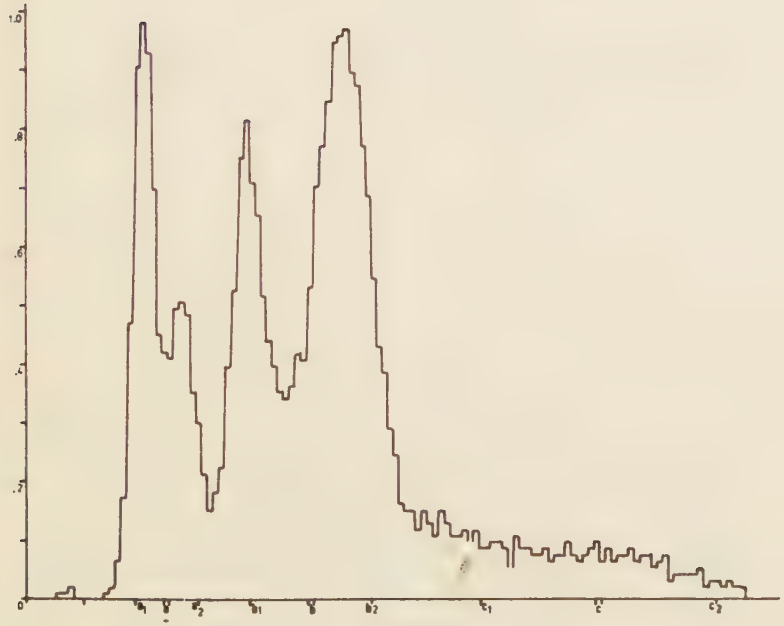
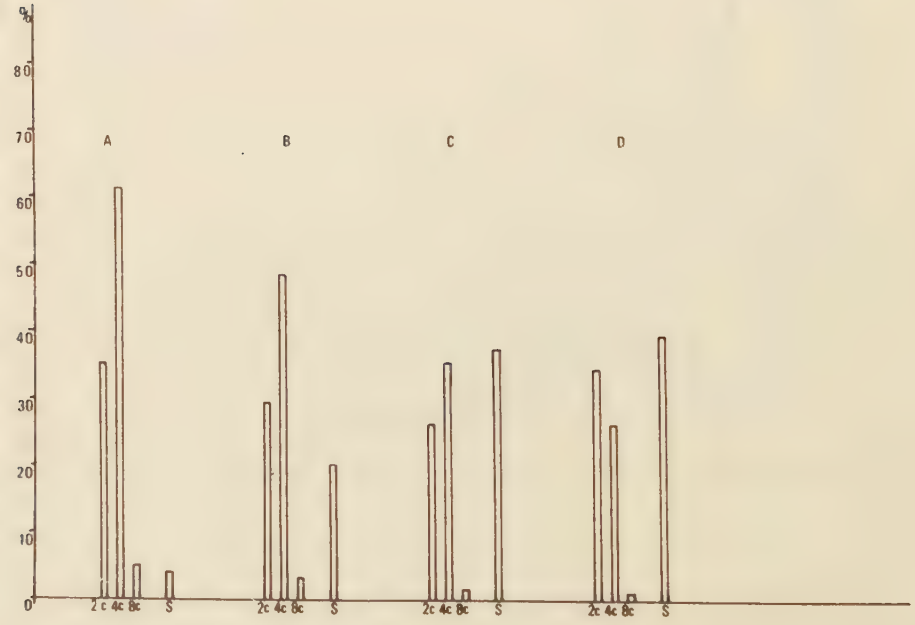


Abbildung 27 : IMPULSCYTOPHOTOMETRIE

Ergebnisse der Histogrammauswertung
Veränderungen im Ploidiemuster von Leberzellen bedingt durch Hepatektomie bzw Hepatektomie und HU-Infusion im Vergleich zu unbehandelten Leberzellen.(Ratte 2oo gr KG)

A unbehandelte Leberzellen(unmittelbar nach Hep.isoliert)
B Leberzellen 14 Stunden nach Hepatektomie isoliert
C Leberzellen nach 14-stündiger HU-Infusion isoliert
Beginn der HU-Infusion 14 Stunden nach Hepatektomie
D Leberzellen nach 25-stündiger HU-Infusion isoliert
Beginn der HU-Infusion 14 Stunden nach Hepatektomie

Prozentualer Anteil der diploiden (2c),tetraploiden(4c), octoploiden (8c) Zellen und des Zwischen-(S-)Phasebereichs.



7. LITERATURVERZEICHNIS

1.LEFFERT,H.L.:Growth control of differentiated fetal rat hepatocytes in primary monolayer culture:VII.Hormonal control of DNA synthesis and its possible significance to the problem of liver regeneration.
J.Cell Biol. 62,792-8o1(1974)

2.PAUL,D.,WALTER,S.:Growth control in primary fetal rat liver cells in culture.
J.Cell Physiol. 85, 113-124 (1974)

3.GERSCHENSON,L.E.,OKIGAKI,T.,ANDERSON,M.,MOLSON,J., DAVIDSON,M.B.:Fine structural and growth characteristics of cultured rat liver cells.Insulin effects.
Exptl.Cell Res.71, 49-58 (1972)

4.ALWEN,J.,GALLHAI-ATCHARD,J.J.:A method of maintaining parenchymal cells from adult rat liver in vitro.
J.Cell Sci. 11, 249-26o (1972)

5.LEFFERT,P.:Studies on primary cultures of differentiated fetal liver cells.
J.Cell Biol. 52, 559-568 (1972)

6.DICKSON,J.A.:Metabolism of adult rat liver cells in filter well culture.
Exptl.Cell Res. 64, 17-28 (1971)

7.IYPE,P.T.:Cultures from adult rat liver cell.I.Establishment of monolayer cell cultures from normal liver.
J.Cell Physiol. 78, 281-288 (1971)

8.WILLIAMS,G.M.,WEISBURGER,E.K.,WEISGURGER,J.H.:Isolation and long term cell culture of epithelial like cells from rat liver.
Exptl.Cell Res. 69, 1o6-112 (1971)

9.BISSEL,D.M.,HAMMAKER,L.E.,MEYER,U.:Parenchymal cells from adult rat liver in nonproliferating monolayer culture.
J.Cell Biol. 59, 722-734 (1973)

1o.GRISHAM,J.W.,THAL,S.B.,NAGEL,A.:Cellular derivation of continuously cultured epithelial cells from normal rat liver.
Gene Expression and Carcinogenesis in cultured Liver (L.E.GERSCHENSON and E.B.THOMPSON) pp 13-3o
Academic Press New York 1975

11.PARIZA,M.W.,YAGER,J.D.,GOLDFARB,S.,GURR,J.A., YANAGI,S.,GROSSMANN,S.H.,BECKER,J.E.,BARBER,T.A., POTTER,V.R.:Biochemical,autoradiographic and electron-microscopic studies of adult rat liver parenchymal cells in primary culture.
Gene Expression and carcinogenesis in cultured Liver (L.E.GERSCHENSON and E.B.THOMPSON) pp 137-167
Academic Press New York 1975

12.RABES,H.M.,JANTSCH,B.:Proliferation der Hepatozyten in primären Leberzellkulturen,
Z.Zellforschung 112, 414-429 (1971)

13.RABES,H.M.,WRBA,H.:Nukleinsäuresynthese der Leber verschiedener Funktionszustände in vitro und in Konfrontationskultur.
Exptl.Cell Res. 39, 669-677(1965)

14.BISSEL,D.M.,HAMMAKER,L.E.,SCHMID,R.:Liver sinusoidal cells.Identification of a subpopulation for erythrocyte catabolism.
J.Cell Biol. 54, 1o7-119 (1972)

15.WORKSHOP of LIVER CELL CULTURE
Canc.Res. 32, 1998-2ooo (1972)

16.BISSEL,D.M.:Study of hepatocyte function in cell culture. (H.POPPER and F.SCHAFFER eds.)
Progress in Liver Disease,Vol.5 pp 69-82
Grune and Stratton Inc.New York 1976

17.MICHALOPOULOS,G.,PITOT,H.C.:Primary culture of parenchymal liver cells on collagen membrans.
Exptl.Cell Res. 94, 7o-78 (1975)

18.KITAGAWA,T.,MICHALOPOULOS,G.,PITOT,H.C.:Unscheduled DNA synthesis in cells from N-2fluorenylacetamide-induced hyperplastic nodules of rat liver maintained in a primary culture system.
Canc.Res. 35, 3682-3692 (1975)

19.RICHMANN,R.A.,CLAUS,T.B.,PILKIS,S.J.,FRIEDMANN,D.L.:
Hormonal stimulation of DNA synthesis in primary culture of adult rat hepatocytes.
Proc.Natl.Acad.Sci.(USA) 73, 3588-3593 (1976)

2o.LEFFERT,P.,WEINSTEIN,D.B.:Growth control of differentiated fetal rat liver cells in primary monolayer culture.
J.Cell Biol. 7o, 2o-23 (1976)

21.SEGLEN,P.O.,REITH,A.:Ammonia inhibition of protein degradation in isolated rat hepatocytes.
Exptl.Cell Res.1oo, 276-28o (1976)

22.PAUL,D.,LEFFERT,H.,SATO,G.,HOLLEY,R.W.:Stimulation of DNA and protein synthesis in fetal rat liver cells by serum from partially hepatectomiced rats.
Proc.Natl.Acad.Sci.(USA) 69, 374-377 (1972)

23.GERSCHENSON,L.E.:Tyrosine transaminase induction by dexamethasone in a new RLCL.
SCIENCE 17o, 859 (197o)

24.LEFFERT,H.L.:Growth control of differentiated fetal rat hepatocytes in primary monolayer culture.V.
J.Cell Biol. 62, 767-779 (1974)

25.KOCH,K.,LEFFERT,H.L.:Growth control of differentiated fetal rat hepatocytes in primary monolayer culture.VI.
J.Cell Biol. 62, 767-779 (1974)

26.HIRSINGER,H.,GAUTSCHI,J.R.,SCHINDLER,R.:DNA synthesis and mitotic activity in short term culture of hepatocytes isolated from regenerating rat liver.
Expt. Cell Res. 1oo, 356-364 (1976)

27.RABES,H.M.,TUCZEK,H.V.:Quantitative autoradiographische Untersuchungen zur Heterogenität der Leberzellproliferation nach partieller Hepatektomie.
Virchows.Arch.Abt.B Zellpath. 4 3o2-312 (197o)

28.GRISHAM,J.W.:A morpholgic study of DNA synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver,autoradiography with thymidine-H^3.
Cancer Res. 22, 842-849 (1962)

29.LE CAM,A.,GUILLOUZO,A.,FREYCHET,P.:Ultrastructural and biochemical studies of isolated adult rat hepatocytes prepared under hypoxid conditions.
Exptl.Cell Res. 98, 382-395 (1976)

3o.RAYEWSKY,M.F.:Proliferative parameters of mammalian cell systems and their role in tumor growth and carcinogenesis.
Z.Krebsforschung 78, 12-3o (1972)

31.RABES,H.M.,TUCZEK,H.V.,WIRSCHING,R.:Kinetics of hepatocellular proliferation after partial hepatectomy as a function of structural and biochemical heterogenity of the rat liver.
Liver regeneration after experimental injury (R.LESCH and W.REUTTER eds.)pp35-55, Stratton Intercontinental Medical Book Corp.New York(1975)

33.CASANELLO,D.E.,GERSCHENSON,L.E.:Some morpholgical and biochemical characteristics of isolated rat liver cells dissociated with sodium tetraphenylboron and cultured in suspension.
Exptl.Cell Res. 59, 283-29o (197o)

34.SCHINDLER,R.,BÜRKI,K.,HIRSINGER,H.:Experimental factors modifying the proliferative response in liver regeneration.
III.Workshop on Experimental Liver Injury Freiburg i.Breisgau,W.Germany,(R.LESCH and W.REUTTER eds)
Liver Regeneration after Experimental Injury (1973)

35.REED,G.B.,GRISHAM,J.W.:Insulin and hydrocortisone effects on viability and glycogen stores of postnatal rat liver organ culture.
Lab.Invest. 33, 298 ff (1975)

36.BUCHER,N.L.R.,SHWAFFIELD,M.N.:The rate of incorporating of labelling Thymidine into the DNA of regenerating rat liver.
Cancer Res. 24, 1611 ff (1964)

37.BAUGNET-MAHIEU,L.,GOUTIER,R.,BAES,C.:Differential response of mitochondrial and nuclear DNA synthesis to Hydroxyurea in normal and regenerating rat liver. Biochem.Pharmacol. 2o, 141-149 (1971)

38.RAYEWSKY,M.F.:Synchronisation in vivo:Kinetics of a malignant cell system following temporary inhibition of DNA synthesis with Hydroxyurea. Exptl.Cell Res. 6o,269-276 (197o)

39.PHILIPS,F.S.,STERNBERG,S.S.,SCHWARZ,H.S.:Hydroxurea. I.Acute cell death in proliferating tissue in rats. Cancer Res. 27, 61-74 (1967)

4o.YOUNG,C.W.,HODAS,S.:Hydroxyurea:Inhibitory effect on DNA metabolism. SCIENCE 146, 1172-1174 (1964)

41.SINCLAIR,W.K.:Hydroxyurea:Differential lethal effects on cultured mammalian cells during the cell cycle. SCIENCE 15o,1729-1731 (1965)

42.MOHLER,W.C.:Cytotoxity in HU reversible by pyrimidine desoxyribosides in a mammalian cell line growth in vitro. Cancer Chemoth.Report 34, 1-6 (1964)

43.KIM,J.H.,GELBARD,A.S.,PEREZ,A.G.:Action of Hydroxyurea on the nucleic acid metabolism and viability on HeLa cells. Cancer Res. 27, 13o1-13o5 (1967)

44.FRENKEL,E.P.,SKINNER,W.N.,MILEY,J.D.:Studies on metabolic defect induced by Hydroxyurea(NSC-32o65). Cancer Chemoth.Report 4o, 19-22 (1964)

45.SCHWARZ,H.,CAROFALO,M.,STERNBERG,S.S.:Hydroxyurea:Inhibition of DNA synthesis in regenerating liver of rat. Cancer Res. 25, 1867-187o (1965)

46.WALTERS,R.A.,TOBEY,R.A.,HILDEBRAND,C.E.:Hydroxyurea does not prevent synchronized chinese hamster cells from entering the DNA synthesis period. Biochem.Biophys.Res.Comm. 69, 212-217 (1976)

47.ADAMS,R.L.P.,LINDSAY,J.G.:Hydroxyurea:Reversal of inhibition and use as a synchronizing agent. J.Biol.Chem.242, 1314-1317 (1967)

48.YARBO,J.W.,NIEHAUS,W.G.,BARNUM,C.P.:Effects of Hydroxyurea on regenerating rat liver. Biochem.Biophys.Res.Commun.19, 592-597 (1965)

49.SASOVETZ,D.,LEA,M.A.,MUSELLA,A.:Reversible inhibition of DNA synthesis. Cancer Rse. 3o, 1994 (197o)

5o.FARBER,E.,BASERGA,R.:Differential effects of Hydroxyurea on survival of proliferating cells in vivo. Cancer Res. 29, 136-139 (1969)

51.BERRY,M.N.,SIMPSON,F.O.:Fine structure of cells isolated from adult mouse liver. J.Biol.Chem. 15, 9 (1962)

52.BERRY,M.N.:Metabolic properities of cells isolated from adult liver. J.Cell Biol. 15, 1-8 (1962)

53.BERRY,M.N.,FRIEND,D.S.:High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. J.Cell Biol. 43, 5o6-519 (1969)

54.CASANELLO,D.E.,GERSCHENSON,L.E.:Some morphological and biochemical characteristics of isolated rat liver cells dissociated with sodium tetraphenylboron and cultured in suspension. Exptl.Cell Res. 59, 283-29o (197o)

56.CECCARINI,C.,EAGLE,H.:Induction and reversal of contact inhibition of growth by pH modification. Nature New Biol. 233, 271 (1971)

57.DROCHMANNS,P.,WANSON,J.G.,MOSSELMANS,R.:Isolation of adult rat hepatocytes. J.Cell Biol. 66, 1-22 (1975)

58.CURTIS,A.:Cell contact and adhesion. Biol.Rev.(Camb.) 37, 82 (1962)

59.FIGUERA,E.,VALLEJOS,R.,PFEIFFER,A.,KAHLER,C.:Effect of oxygen pressure on glycogen synthesis by rat liver cells.
Biochem.J. 98, 253 (1966)

60.GALLAI-HATCHARD,J.,GRAY,G.M.:A method of obtaining a suspension of intact parenchymal cells from adult rat liver.
J.Cell Sci. 8, 73 (1971)

61.HARRIS,C.C.,LEONE,C.A.:Some effects of EDTA and tetraphenylboron on the ultrastructure of mitochondria in mouse liver cells.
J.Cell Biol. 28, 405-408 (1966)

62.HOMMES,F.A.,DRAISMA,M.I.,MOLENAAR,I.:Preparation and some properities of isolated rat liver cells.
Biochim.Biophys.Acta 222, 361- 371 (1971)

63.HOMMES,F.A.,OUDMANN-RICHTERS,A.R.,MOLENAAR,I.:The preparation of isolated fetal liver cells.
Biochim.Biophys.Acta 244, 191-199 (1971)

64.GINGELL,D.,GARROD,D.:Calcium and cell function.
(A.W.CUTHBERT ed.)p 59,MACMILLAN,London (1970)

65.HARRISON,M.F.:Percentage of binucleated cells in the liver of adult rats.
Nature 171, 611 (1953)

66.HOWARD,R.B.,CHRISTENSEN,A.K.,GIBBS,F.A.,PESCH,L.A.:
The enzymatic preparation of isolated parenchymal cells from rat liver.
J.Cell Biol. 35, 675-684 (1967)

67.HOWARD,R.B.,LEE,J.C.,PESCH,L.A.:The fine structure, potassium content and respiratory activity of isolated intact parenchymal cells prepared by improved enzymatic techniques.
J.Cell Biol. 57, 642-658 (1973)

68.INGENBRETSEN,W.R.,WAGLE,S.R.:A rapid method for the isolation of large quantities of rat liver parenchymal cells with high anabolic rates.
Biochem.Biophys.Res.Commun. 47, 403 (1972)

69.KAHN,C.,FREYCHET,P.,NEVILLE,D.M.:Quantitative aspects of the insulin receptor in liver plasma membranes. J.Biol.Chem. 249, 2249 (1974)

7o.KALANT,H.,MIYATHA,R.:Metabolic alterations in tissue perfused with decalcifying agents. Biochem.J. 86, 336 (1963)

71.KALTENBACH,J.P.:Preparation of suspension of intact liver cells. Fed.Proc. 11, 237-238 (1952)

73.LEESON,T.S.,KALANT,H.:Effect of in vivo decalcification on ultrastructure of adult rat liver. J.Biochem.Cytol. 1o, 95-1o4 (1961)

74.MÜLLER,M.,SCHREIBER,M.,KARTENBECK,J.,SCHREIBER,G.: preparation of single suspension from normal liver, regenerating liver and Morris Hepatoma 9121,5123 tc. Cancer Res. 32, 2568-2576 (1972)

75.FRY,J.R.,JONES,C.A.:The enzymatic isolation of adult rat hepatocytes in a functional and viable state. Analyt.Bioch. 71, 341-35o (19767)

76.SEGLEN,P.O.:Preparation of rat liver cells:III.Enzymatic requirement for tissue dispersion. Exptl.Cell Res. 82, 391-398 (1973)

77.SEGLEN,P.O.:Preparation of rat liver cells:I.Effects of Ca^{++} on enzymatic dispersion of isolated, perfused liver. Exptl.Cell Res. 74, 45o-454 (1972)

78.SEGLEN,P.O.:Preparation of rat liver cells:II.Effects of ions and chelators on tissue dispersion. Exptl.Cell Res. 76, 25-3o (1973)

79.SEGLEN,P.O.:The effect of perfusate pH on respiration and glycolysis in the isolated rat liver perfusated with an erythrocyte and protein free medium. Biochim.Biophys.acta 264, 398-41o (1972)

8o.ISELER,G.:Untersuchungen zur Synchronisation der DNA-Synthese in der regenerierenden Rattenleber nach Hydroxyharnstoff-Dauerbehandlung. Dissertation München 1977

81.SANDSTRÖM,B.:Studies on cells from liver tissue cultivated in vitro.Influence of the culture method on cell morphology and growth pattern.
Exptl Cell Res. 37, 551 (1965)

82.STEVENS,K.M.:Oxygen requirement for liver cells in vitro
Nature 2o6, 199 (1965)

83.YAGER,J.D.:Liver regeneration after experimental injury.
(R.LESCH and W.REUTTER eds)p 148 Stratton Intercontinental Medical Book Corp.New York (1975)

84.JACOB,S.T.,BHARGAVA,P.M.:A new method for the preparation of liver cell suspensions.
Exptl Cell Res. 22, 453-467 (1962)

85.ANDREEFF,M.:Impulscytophotometrische DNA-Bestimmung proliferierender Systeme.
Impulscytophotometrie (M.ANDREEFF ed) pp 73-76
Springer-Verlag Berlin,Heidelberg,New York 1975

86.HAAG,D.:Untersuchungen zur Proportionalität zwischen DNA-Gehalt und Fluoreszenzemission fluorochromierter Einzelzellen.
Impulscytophotometrie (M.ANDREEFF ed.) pp 7-1o
Springer-Verlag,Berlin,Heidelberg,New York 1975

87.SEVERIN,E.:Zum Problem der Selektivität von Ethidiumbromid in der Cytophotometrie zellulärer DNA.Vergleichende cytophotometrische Untersuchungen an Leberzellen.
Impulscytophotometrie (M.ANDREEFF ed.) pp 2o-3o
Springer-Verlag Berlin,Heidelberg,New York 1975

88.GORYSCH,H.,PFITZER,P.:Vergleichende Messung an Ergüssen mit dem Impulscytophotometer und dem Mikroskopphotometer.
Impulscytophotometrie (M.ANDREEFF ed.) pp 122-142
Springer-Verlag Berlin,Heidelberg,New York 1975

89.BERKHAN,E.:Die günstigste Farbstoffkonzentration für Anlagerungsfärbungen.
Impulscytophotometrie (M.ANDREEFF ed.) pp 1-14
Springer-Verlag,Berlin,Heidelberg,New York 1975

90. BÜCHNER, Th., HIDDEMANN, W., SCHNEIDER, R.: Zur Präparation von Blut- und Knochenmarkszellen für die Impulscytophotometrie.
Impulscytophotometrie (M. ANDREEFF ed.) pp 46-49
Springer -Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1975

91. LEPECQ, J.B., PAOLETTI, C.: A fluorescent complex between Ethidium-bromide and nucleid acids.
J. Molec. Biol. 27, 1116 (1974)

92. HORAN, P.K., WHEELESS, L.L.: Quantitative single cell analysis and sorting
SCIENCE 198, 149-157 (1977)

93. RABES, H.M., ISELER, G., TUCZEK, H.V., KERLER, R.: Increased synchrony of DNA synthesis in regenerating rat liver after continuous infusion of Hydroxyurea.
Experienta 30, 1116 (1974)

94. RABES, H.M., ISELER, G., TUCZEK, H.V., KERLER, R.: Synchronized liver cells: A new tool for analysis cell cycle dependent carcinogen binding to DNA in vivo.
Experienta 31, 686 (1975)

95. RABES, H.M., ISELER, G., CZICHOS, S., TUCZEK, H.V.: Synchronisation of hepatocellular DNA synthesis in regenerating rat liver by continuous infusion of Hydroxyurea.
Cancer Res. 37, 1105-1111 (1977)

96. ANDREEFF, M.: Effects of different cytostatic agents on cell proliferating and DNA synthesis in ERLICH-ascites tumors.
Molecular Base of Malignancy pp 154-166
Georg Thieme Stuttgart 1976

97. TUCZEK, H.V., RABES, H.M.: Autoradiographische Untersuchungen über intralobuläre Differenzen der Flußrate von Hepatozyten in das S-Kompartiment in Frühstadien nach partieller Hepatektomie.
Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 15, 55-63 (1973)

98. TUCZEK,H.V.,SKORUPPA,W.,RABES,H.M.:Zellkinetische Untersuchungen zur Interferenz zwischen Proliferations-und Funktionsstoffwechsel in der regenerierenden Rattenleber nach Applikation von Phenobarbital. Virchows Arch.Abt.B Zellpath. 17, 347-361 (1975)

99.STÖCKER,E.:Der Proliferationsmodus in Niere und Leber. Verh.Dtsch.Ges.Pathol. 5o, 53-74 (1966)

1oo.RABES,H.M.,WIRSCHING,R.,TUCZEK,H.V.,ISELER,G.: Analysis of cell cycle compartments of hepatocytes after partial hepatectomy Cell Tissue Kinet. 9, 517-532 (1976)

1o1.SCHMIDKONZ,P.,HÜBNER,G.,RABES,H.M.:Morphometrische Untersuchungen zur hepatozellulären Hypertrophie bei Hydroxyharnstoff-induziertem "unbalanced growth". Verh.Dtsch.Ges.Path. 61, 473 (1977)

1o2.GRUNDMANN,E.,SEIDEL,H.J.:Die reparative Parenchymregeneration am Beispiel der Leber nach Teilhepatektomie. Handbuch der Allgemeinen Pathologie,Band II, Entwicklung und Wachstum Springer-Verlag Berlin,Heidelberg,New York 1969

1o3.GALOSI,A.:Untersuchungen zur DNA-Synthese in der isoliert-perfundierten regenerierenden Rattenleber. Dissertation,München 1977

1o4.SCHINDLER,R.:Biochemie der Regeneration. Handbuch der Allgemeinen Pathologie Band II Entwicklung und Wachstum Springer-Verlag Berlin,Heidelberg,New York 1969

1o5.SENN,H.J.,LANG,H.J.,FEIL,E.:Impulscytophotometrische Charakterisierung des DNA-Verteilungsmusters in reaktiven und neoplastischen Knochenmarksexudaten. Impulscytophotometrie (M.ANDREEFF ed.) pp 143-153 Springer-Verlag Berlin,Heidelberg,New York 1975

1o6.BÜCHNER,Th.,GÖHDE,W.,SCHNEIDER,R.,HIDDEMANN,R.:
Zellsynchronisation und cytoide Effekte durch Chemotherapie der Leukämie in der Klinik anhand der Impulscytophotometrie.
Impulscytophotometrie (M.ANDREEFFed.) pp 77-86
Springer -Verlag Berlin,Heidelberg,New York 1975

1o7.ANDREEFF,M.,HAAG,D.:Fluorochromierung mit Acridinorange in der Impulscytophotometrie.
Impulscytophotometrie (M.ANDREEFF ed.) pp 31-37
Springer-Verlag Berlin,Heidelberg,New York 1975

1o8.LANG,H.J.,FEIL,E.,SENN,H.J.:Zur Methodik der impulscytophotometrischen DNA-Bestimmung in normalen und pathologischen Zellpopulationen.
Impulscytophotometrie (M.ANDREEFF ed.) pp 14-19
Springer-Verlag Berlin,Heidelberg,New York 1975

1o9.SPRENGER,E.:Der Einfluß der Färbemethoden auf die Ergebnisse automatischer Zellkernbestimmung.
Impulscytophotometrie (M.ANDREEFF ed.) pp3-6
Springer-Verlag Berlin,Heidelberg,New York 1975

11o.JENSEN,R.H.,LANGLOIS,R.G.,MAYALL,B.H.:Strategies for choosing a DNA stain for flowcytophotometry metaphase chromosomes.
J.Histochem.Cytochem. 25,954-964 (1977)

111.SHACKNEY,S.E.,FORD,S.S.:Correlations between the DNA content distribution and tritiated thymidine studies in relation to population size in sarcoma 18o in vitro.
Cancer Res. 34, 14o1-14o7 (1974)

112.TRUITT,A.J.,ALVAREZ,M.R.:Quantitative cytochemical changes induced by dexamethasone and adrenalektomie in rat liver chromatin.
Exptl.Cell Res. 1oo, 258-264 (1976)

113.TUCZEK,H.V.,RABES,H.M.:Autoradiographische Untersuchungen zur nukleären 3H-Thymidin-Inkorporation im Homogenat regenerierender Leber.
Beitr.Path. 147, 221-227 (1972)

114.GRAY,J.W.:Cell cycle analysis from computer synthesis of DNA histogramms.
J.Histochem.Cytochem. 22, 643-65o (1974)

115.ORGAS,H.:Wirkung von Ultraschall auf gynäkologisches Abstrichmaterial.
Impulscytophotometrie (M.ANDREEFF ed.)pp 55-58
Springer-Verlag Berlin,Heidelberg,New York 1975

116.ANDREEFF,M.,BOTHMANN,G.:Gewinnung von Einzelzell-suspensionen aus soliden Geweben zur fluoro-metrischen DNA-Bestimmung.
Impulscytophotometrie (M.ANDREEFF ed.) pp 59-65
Springer-Verlag Berlin,Heidelberg,New York 1975

117.BARLOGIE,B.,DREWINKO,B.,JOHNSTON,D.A.,BÜCHNER ,Th.:
Pulse cytophotometric analysis of synchronized cells in vitro.
Cancer Res. 36, 1176-1181 (1976)

118.BARLOGIE,B.,DREWINKO,B.,SCHUMANN,J.,FREIREICH,E.J.:
Pulse cytophotometric analysis of cell cycle perturbation with Bleomycin in vitro.
Cancer Res.36, 1182-1187 (1976)

119.TOBEY,R.A.,CRISSMANN,H.A.:Comparative effects of three nitrosourea derivates in mammalian cell cycle progression.
Cancer Res. 35, 46o-47o (1975)

12o.TOBEY,R.A.,CRISSMANN,H.A.,KRAEMER,P.M.:A method for comparing effects of different synchronizing protocols on mammalian cell cycle traverse.
J.Cell Biol. 54, 638-645 (1972)

121.BRESNICK,E.:Regenerating Liver:An experimental model for the study of growth.
Method in Cancer Res.VI.
Academic Press New York 1971

122.DEAN,Ph.N,JETT,J.H.:Mathematical analysis of DNA distribution derived from flow microfluorometry. J.Cell Biol. 60, 523-527 (1974)

123.RABES,H.M.,WIRSCHING,R.,TUCZEK,H.V.:Die Dauer des Leberzellzyklus nach partieller Hepatektomie. Naturwissenschaften 59, 221-222 Springer-Verlag Berlin,Heidelberg,New York 1972

LEBENSLAUF

Am 26.6.1952 wurde ich als Siebtes von acht Kindern des Augsburger Pathologen Dr.Eberhard Emminger und seiner Ehefrau Elisabeth geboren.

Nach vierjähriger Volkschulzeit besuchte ich 1962 das Humanistische Gymnasium bei St.Anna in Augsburg, an dem ich 1971 das Abitur ablegte.

Im Wintersemester 1971/1972 begann ich an der Ludwig-Maximilian-Universität in München das Studium der Humanmedizin.Den dritten und letzten Teil der ärztlichen Prüfung bestand ich im Mai 1978.

Im September 1975 begann ich am Pathologischen Institut der Universität München in der Abteilung für Experimentelle Pathologie mit meiner Promotionsarbeit.

Seit Januar 1979 bin ich als Assistent am Städtischen Krankenhaus München-Schwabing in der IV.Medizinischen Abteilung tätig.